

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**HALINA BINDE DORIA**

USO DE BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS NA ANÁLISE DA  
TOXICIDADE DO CLORETO DE COBRE EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*)

**CURITIBA  
2010**

**HALINA BINDE DORIA**

**USO DE BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS NA ANÁLISE DA  
TOXICIDADE DO CLORETO DE COBRE EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*)**

Monografia apresentada à disciplina de  
Estágio em Farmacologia como requisito  
parcial para a obtenção do grau de  
Bacharel em Ciências Biológicas, Setor de  
Ciências Biológicas, Universidade Federal  
do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helena Cristina da  
Silva de Assis

Co-orientadora: MSc. Izonete Cristina  
Guiloski

**CURITIBA  
2010**

## **AGRADECIMENTOS**

A minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Helena Cristina da Silva de Assis pela confiança no meu trabalho, paciência, orientação e bom humor que sempre me recebeu.

A Cris que me ajudou tanto na parte de biomarcadores enzimáticos e a Maritana que me ensinou a leitura das lâminas histológicas, muito obrigada pelo tempo e paciência que tiveram comigo.

Aos meus pais que sempre me apoiaram em todas as minhas escolhas.

Aos meus colegas de laboratório que sempre me proporcionaram boas conversas e risadas: Cris, César, Letícia e Jéssica.

Aos meus amigos Janaína, Francine, Alejandro, Andréia, Anne, André, Joyce, Patrícia e Vanessa que tornam minha vida tão divertida!

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

## RESUMO

O cloreto de cobre ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) é uma substância amplamente utilizada como desinfetante, desodorante e dessulfurizante em destilados de petróleo, na purificação de água, como aditivo alimentar e principalmente, como biocida. O jundiá *Rhamdia quelen*, organismo bioindicador do presente trabalho, é um peixe de distribuição neotropical encontrado em rios paranaenses. O cultivo dessa espécie vem aumentando nos últimos anos devido sua boa aceitação pelo mercado consumidor. O uso de biomarcadores possibilita avaliar o efeito causado por diferentes contaminantes, como o cobre, nos seres vivos. Eles podem ser definidos como respostas biológicas adaptativas a estressores, evidenciadas como alterações bioquímicas, celulares, histológicas fisiológicas ou comportamentais. Este trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade do cloreto de cobre em jundiás (*Rhamdia quelen*) utilizando biomarcadores histológicos e bioquímicos por meio de um bioensaio estático. Os peixes ( $n=80$ ) foram distribuídos em grupos controle e teste, sendo expostos por 96 horas às concentrações de 2  $\mu\text{g/L}$ , 10  $\mu\text{g/L}$  e 20  $\mu\text{g/L}$  de cloreto de cobre. Em fígado, os parâmetros analisados foram a histopatologia e as atividades enzimáticas: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST) e glutathione redutase (GR), além da peroxidação de lipídica (LPO). A análise da atividade da acetilcolinesterase (AChE) foi realizada em músculo e cérebro. Os resultados obtidos permitiram concluir que o cloreto de cobre é tóxico para a espécie principalmente, nas concentrações de 10  $\mu\text{g/L}$  e 20  $\mu\text{g/L}$ . A atividade da SOD e a análise histopatológica com a presença de centros de melanomacrófagos (CMM) podem ser utilizados como biomarcadores para a exposição ao cloreto de cobre, pois foram os que mais responderam.

Palavras-chave: Cobre, jundiá, estresse oxidativo, histopatologia.



## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Distribuição e especiação do cobre em águas naturais.....	10
Figura 2: Especiação do cobre em função do pH.....	11
Figura 3: Exemplar de <i>Rhamdia quelen</i> .....	19
Figura 4: Respostas dos organismos à poluição ambiental .....	21
Figura 5: Atividade da GST em <i>Rhamdia quelen</i> expostos ao cloreto de cobre .....	37
Figura 6: Atividade da SOD em <i>Rhamdia quelen</i> expostos ao cloreto de cobre .....	38
Figura 7: Atividade da CAT em <i>Rhamdia quelen</i> expostos ao cloreto de cobre .....	38
Figura 8: Atividade da GR em <i>Rhamdia quelen</i> expostos ao cloreto de cobre .....	39
Figura 9: Lipoperoxidação em <i>Rhamdia quelen</i> expostos ao cloreto de cobre .....	39
Figura 10: Atividade da AchE muscular em <i>Rhamdia quelen</i> expostos ao cloreto de cobre .....	40
Figura 11: Atividade da AchE cerebral em <i>Rhamdia quelen</i> expostos ao cloreto de cobre .....	40
Figura 12: Índice de lesão histopatológica de fígado de <i>Rhamdia quelen</i> expostos ao cloreto de cobre.....	41
Fígura 13: Contagem de centros de melanomacrófagos e melanomacrófagos livres em fígado de <i>Rhamdia quelen</i> expostos ao cloreto de cobre .....	42
Figura 14: Cortes histológicos de fígado de <i>Rhamdia quelen</i> do grupo controle .....	43
Figura 15: Cortes histológicos de fígado de <i>Rhamdia quelen</i> do grupo exposto a 2µg/L .....	44
Figura 16: Cortes histológicos de fígado de <i>Rhamdia quelen</i> do grupo exposto a 10µg/L .....	45
Figura 17: Cortes histológicos de fígado de <i>Rhamdia quelen</i> do grupo exposto a 20µg/L .....	46
Tabela 1: Alterações histopatológicas e seus respectivos fatores de importância...	36

## SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	v
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 Metais Pesados .....	2
1.2 Cobre: Fontes e Usos.....	4
1.3 Cobre: Propriedades químicas e bioquímicas .....	8
1.4 Cloreto de cobre .....	16
1.5 Bioindicador: Rhamdia quelen .....	19
1.6 Biomarcadores.....	20
1.6.1 Biomarcadores de Biotransformação .....	21
1.6.2 Biomarcadores de Estresse Oxidativo .....	22
1.6.3 Biomarcador de Neurotoxicidade – Acetilcolinesterase (AChE).....	27
1.6.4 Histopatologia .....	28
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
2.1 Objetivo Geral.....	30
2.2 Objetivos específicos .....	30
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
3.1 Desenho experimental.....	31
3.2 Biomarcadores bioquímicos.....	31
3.2.1 Atividade da GST .....	32
3.2.2 Atividade da CAT .....	32
3.2.3 Atividade de SOD.....	33
3.2.4 Atividade da GR .....	33
3.2.5 Lipoperoxidação .....	33
3.2.6 Atividade da AChE .....	34
3.2.7 Análise da concentração de proteína.....	34
3.3 Biomarcador Histopatológico .....	35
3.3.1 Microscopia de luz - Análise histopatológica de fígado.....	35
3.3.2 Avaliação histopatológica.....	35
3.3.3 Análise quantitativa dos centros de melanomacrófagos e melanomacrófagos livres em fígado .....	36
3.4 Análises estatísticas .....	36
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
4.1 Biomarcadores bioquímicos.....	37
4.1.1 Atividade da Glutathione S-transferase.....	37
4.1.2 Atividade das enzimas antioxidantes e lipoperoxidação .....	37
4.1.3 Atividade da AChE .....	39
4.2 Análise histopatológica .....	40
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>56</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os chamados metais pesados estão presentes desde muito cedo na história da humanidade. O cobre é considerado como o primeiro metal já utilizado pela espécie humana, artefatos manufaturados com esse metal datam de 4.000 anos a.C.(NAVARRO, 2006). A intensa utilização do cobre seja ele na forma metálica ou de compostos cúpricos e a natural abundância no meio, torna inevitável a exposição dos seres vivos a este metal. Mesmo que seja essencial à vida, em altas concentrações, ele pode causar dano aos organismos (EISLER, 1998).

No ambiente aquático o estado de oxidação mais importante do cobre é o bivalente ( $\text{Cu}^{+2}$ ), ele é o mais biodisponível e tóxico das espécies inorgânicas. Porém, a concentração de íons livres é sensível à formação de complexos a ligantes orgânicos e inorgânicos, a adsorção e particulação e consequente, deposição no sedimento. O conhecimento da especiação do cobre também permite a avaliação da toxicidade que ele pode causar (TEMPLETON *et al.*, 2000; PEDROZO & LIMA, 2001).

O cloreto de cobre, composto utilizado no experimento em questão, é muito utilizado como desinfetante, em destilados de petróleo, na purificação de água e como aditivo alimentar, mas principalmente, como fungicida e bactericida mesmo com vários relatos de fitotoxicidade (PEDROZO & LIMA, 2001). Como o ambiente aquático é um receptor de muitos poluentes, incluindo os metais como o cobre, é provável que haja algum prejuízo aos animais aquáticos que nele vivem. Assim, os estudos de toxicologia ambiental com organismos aquáticos permitem a mensuração dos efeitos desses poluentes nos seres participantes do ecossistema aquático complementando as análises realizadas em outras áreas de estudo.

A espécie *Rhamdia quelen* foi escolhida como bioindicador no presente trabalho por ser um peixe nativo da região e devido à utilização desta espécie como alimento estar crescendo, além da fácil manutenção em condições laboratoriais (GOMES *et al.*, 2000).

Sabe-se que a pesquisa laboratorial é de grande importância quando essa apresenta resultados extrapoláveis ao campo. Então, o uso de biomarcadores faz-se de grande importância para a avaliação da toxicidade de diversos compostos

potencialmente poluentes, pois ele apresenta respostas rápidas e permite a predição de efeitos adversos nos organismos (VAN DER OOST et al., 2003). Assim, o presente estudo pode contribuir com informações que permitem a melhor compreensão e a resolução dos problemas ambientais.

### 1.1 Metais Pesados

O termo “metal pesado” é usado principalmente para definir compostos químicos com propriedades potencialmente tóxicas ou ecotóxicas. A categorização e classificação de substâncias pode ser muito útil, pois permite uma rápida e simples associação com outras que tem propriedades em comum. Porém, por definição, o termo é considerado arbitrário e muito impreciso. As limitações são claras: a palavra “metal” é convencionalmente, usada para se referir ao elemento puro ou ligas metálicas e “pesado” implica alta densidade. Dessa maneira, se levarmos em conta o sentido literal dessas palavras, o conhecimento da densidade contribui minimamente para a predição dos efeitos biológicos dos metais, especialmente quando os metais ou as ligas em questão não são, na maioria dos casos, as espécies reativas que os organismos vivos estão em contato. Várias explicações para justificar esse nome foram propostas ao longo dos anos em termos de densidade, peso atômico, número atômico, propriedades químicas e toxicidade, mas todas agrupam desiguais grupos de elementos, e ainda mais discrepantes grupos de compostos de elementos químicos (DUFFUS, 2002).

A poluição do ambiente por metais se deu a partir da domesticação do fogo. Com a deposição de pequenas quantidades e de resíduos da queima durante atividades de metalurgia, os níveis dessas substâncias já se alteravam nos ambientes de caverna que habitavam os primeiros hominídeos (NRIAGU, 1996). Além da metalurgia, eles também eram usados como purificadores de água pelos egípcios há 3.000 a.C. e vários eram empregados na fabricação de medicamentos (BERALDO, 2005).

Partindo da antiga afirmação do assim chamado pai da toxicologia, Theophrastus Bombastus von Hohenheim (1493-1541), mais conhecido como Paracelso de que “O que não é tóxico? Todas as substâncias são tóxicas. Apenas a dose correta é que diferencia um veneno de um remédio”. Pode-se afirmar que ela continua atual e correta. Dado que, todos os metais são considerados potencialmente tóxicos e capazes de gerarem efeitos adversos nos sistemas

biológicos quando em concentrações acima do necessário (DALLINGER & RAIMBOW, 1993). A frase aplica-se perfeitamente no caso dos “metais essenciais”, assim chamados por serem indispensáveis para um completo ciclo de vida dos seres vivos (DUFFUS, 2002). Alguns exemplos são: Sódio, Potássio, Manganês, Ferro, Cobre, Zinco e Cálcio. A alta concentração desses metais, dissolvidos nas águas, por exemplo, faz com que eles se acumulem nos tecidos em uma concentração muito maior do que a necessária, causando danos aos sistemas.

A disponibilização de metais no meio aquático dá-se por fontes naturais como lavagem geológica de solos e rochas, diretamente expostos à água, e por fontes antrópicas como efluentes domésticos e industriais, pelo processo de mineração, pela aplicação de pesticidas na agricultura (EBRAHIMPOUR & MUSHRIFAH, 2008) e através de precipitação em áreas com poluição atmosférica (PEREIRA et al., 2006). Como metais são substâncias persistentes no meio e prejudiciais a biota, uma vez que não podem ser degradados ou destruídos, a contaminação por metais dos ambientes aquáticos é considerada uma situação perniciosa. Estudos já mostraram que a toxicidade global anual dos metais mobilizados pela atividade antrópica excede a toxicidade resultante dos desperdícios orgânicos e radioativos (NRIAGU & PACYNA, 1988).

Nos ecossistemas aquáticos, a maioria dos poluentes, incluindo os metais, tendem a precipitar na superfície dos sedimentos (AHMAD & SHUHAIMI-OTHMAN, 2010). Assim sendo, os sedimentos são conhecidos como uma importante fonte de contaminantes e de maneira geral, as concentrações de metais neles são maiores do que na coluna d'água. Mas, as águas intersticiais podem influenciar as concentrações de metais nas águas superficiais por meio de processos como a difusão, consolidação e bioturvação (SALOMONS & FÖRSTNER, 1984) e dependendo das condições abióticas do ambiente que interferem diretamente na especiação dos metais como temperatura, pH, dureza da água potencial de oxirredução da água, ligantes complexadores, partículas em suspensão e carbono, presença de cátions competidores ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ) e ânions de sais cúpricos insolúveis ( $\text{OH}^-$ ,  $\text{S}^{-2}$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$ ,  $\text{CO}_3^{-2}$ ) (PEDROZO & LIMA, 2001), eles podem começar a ser liberados na coluna d'água tornando-se biodisponíveis. Nestas condições podem afetar os organismos aquáticos, sendo incorporados ao longo da cadeia alimentar e consequentemente podendo também causar danos à saúde humana (KHAN et al., 2005).

Porém, a distribuição, o transporte e a biodisponibilidade dos metais em ambientes aquáticos é primeiramente controlados pelo sedimento e depois pela coluna de água. Assim, os metais são concentrados pelo sedimento e partículas em suspensão na água reagindo através de trocas iônicas, adsorção e precipitação (YUAN, 2004). Existem três importantes mecanismos no seqüestro de metais. Adsorção físico-química pela coluna de água, absorção biológica por algas e bactérias e abiótica por sedimentação e em último, aprisionamento físico de partículas por matéria enriquecida. A importância relativa desses três mecanismos será diferente dependendo do sistema aquático em questão (HART, 2004).

A retirada dos metais em solução na água só acontece quando eles são devidamente imobilizados. A capacidade inerente a alguns organismos como bactérias, algas e fungos que podem funcionar como agentes imobilizadores é alvo de vários estudos na comunidade científica, pois se sabe que essa competência pode ser usada em tratamentos para desintoxicação das águas. Porém, de acordo com a espécie utilizada, a origem da biomassa e seu processamento, eles consistem em vários mecanismos que diferem quantitativa e qualitativamente entre si. Assim, o sequestro de metais segue mecanismos complexos, como: troca de íons, quelação, adsorção por forças físicas e aprisionamento de íons em capilares inter e intrafibrilar e espaços da rede de polissacarídeos estruturais como resultado do gradiente de concentração e de difusão através de parede celular e membranas. Vários grupos químicos que atraem e sequestram metais na biomassa já foram identificados como: grupos acetamido da quitina, polissacarídeos estruturais de fungos, os grupos amino e fosfato em ácidos nucleicos, aminoácidos, amido, sulfidrila, grupos carboxila em proteínas, hidroxilas em polissacarídeos, e principalmente, carboxilas e sulfatos em polissacarídeos de algas marinhas de Phaeophyta, Rhodophyta e Chlorophyta (VOLESKY, 1995).

## 1.2 Cobre: Fontes e Usos

O cobre é o mais antigo metal usado pelo homem. Ele caracteriza uma época que pode ser considerada como intermediária entre a idade da pedra e a do bronze. Artefatos feitos com ele datam de 4.500/4.000 a.C. (NAVARRO, 2006). Porém, onde atualmente é o norte do Iraque foi encontrado um colar de cobre de 8.700 a.C, demonstrando que a descoberta acidental deste metal pode ter ocorrido

muito antes. Os antigos gregos da era pré-cristã de Hipócrates (400 a.C) foram os primeiros a descobrir o poder de desinfecção do cobre. Eles receitavam cobre para doenças pulmonares e para purificar a água potável. Os celtas, naturais da Escócia, produziam uísque em vasos de cobre por volta de 800 d.C, e esta prática continua até os dias atuais. Os principais depósitos de cobre da Antiguidade estavam localizados no Sinai, na Síria, no Afeganistão, em Chipre, na Macedônia, na Ibéria e na Europa Central. As principais minas européias da Era do Bronze estavam localizadas na Áustria, Alemanha, França, Espanha, Portugal, Grécia e Tirol (BORKOW & GABBAY, 2004).

No império Romano, intensificou-se o uso do cobre. A mineração e a troca de recursos minerais tornaram-se importantes para o sustento da economia, além, de que as diferentes técnicas utilizadas no manejo dos metais significavam *status* tecnológico (NRIAGU, 2005). A maior parte do cobre usado pelo Império Romano vinha da ilha de Chipre, daí a origem do nome que vem do latim, cuprum, proveniente de Kypros, nome grego da ilha de Chipre, onde foram descobertas as primeiras jazidas deste metal (VON SPERLLING, 2005). Além disso, o cobre foi representado com o mesmo signo que Vênus, pois Chipre estava consagrada a deusa da beleza e os espelhos eram fabricados com este metal. O símbolo, espelho de Vênus da mitologia e da alquimia, foi posteriormente adotado por Carl Linné para simbolizar o gênero feminino (♀).

Apesar de sua antiguidade, o cobre manteve aliado aos outros metais, um papel constante e meritório na evolução da humanidade, sendo utilizado em todas as fases das revoluções tecnológicas já passadas pelo ser humano. Principalmente na revolução elétrica quando Alexandre Volta construiu o dispositivo da pilha. O mecanismo consistia na utilização de uma série de discos de dois metais diferentes, como cobre e zinco, empilhados (daí o nome pilha) alternativamente e entre cada disco havia um pedaço de tecido ou papel embebido com algum ácido (CHAGAS, 2000). Sendo o cobre um dos melhores condutores de eletricidade somente suplantado pela prata, a demanda aumentou exponencialmente, com o desenvolvimento da indústria elétrica. As instalações telefônicas e telegráficas, as centrais hidrelétricas, os motores, os dínamos, os transformadores, os aparelhos de rádio, os cabos, os fios absorvem, hoje, uma quantidade enorme de cobre puro, que não pode ser substituído na maior parte dos casos, por nenhum outro metal.

O cobre é amplamente distribuído na natureza e ocorre naturalmente em muitos minerais, como cuprite ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ), malaquita ( $\text{Cu}_2\text{CO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$ ), azurita ( $2\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$ ), calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ), calcocita ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ), e bornita ( $\text{Cu}_5\text{FeS}_4$ ). As formas malaquita, calcopirita e calcocita são as mais representativas fontes de cobre. Na crosta terrestre apresenta uma abundância natural de aproximadamente 60 mg/kg (50 ppm) e  $2,5 \cdot 10^{-4}$  mg/L nos mares. O conteúdo de cobre nos depósitos minerais varia de 0,5% a 5% do peso. Rochas ígneas contêm 0,010% e as rochas cristalinas 0,0055% em peso (IPCS, 1998; PEDROZO & LIMA, 2001; HSDB, 2000). Os arenitos apresentam entre 10 a 40 ppm, os xistos entre 30 a 150 ppm e os xistos marinhos entre 20 a 300 ppm de cobre (PEDROZO & LIMA, 2001; HSDB, 2000).

No Brasil, em 2005, o consumo de cobre, foi de 1,44 kg *per capita*, e cerca de 0,52 kg, por habitante, ficam "em uso" como estoque, principalmente em infra-estruturas, edifícios, equipamentos elétricos e eletrodomésticos. A geração de resíduos está perto da média europeia de 1,865 kg por habitante, e é menor do que na América Latina que tem 3 kg *per capita*. O Brasil ainda importa cobre principalmente, do Chile e do Peru (TANIMOTO, 2009).

Devido à combinação única de propriedades que compreendem condutividade elétrica e térmica, durabilidade e maleabilidade, 65% do cobre são principalmente, usados na indústria elétrica e eletrônica; 15% na construção civil e os 20% restantes em equipamentos de transporte, ar condicionado e refrigeração, bens de consumo como aparelhos domésticos, cunhagem, munições e produção de ligas como latão e bronze (IPCS, 1998). Os sais de cobre, dentre eles o sulfato e cloreto de cobre, são amplamente utilizados como biocidas no controle de algas e macrófitas, caracóis de água doce que podem ser vetores da esquistossomose e outras doenças, ectoparasitas de peixes e mamíferos, organismos incrustantes marinhos, mofo e doenças de plantas cultivadas. Esses sais também são usados em fertilizantes agrícolas, produtos veterinários e médicos, na indústria de alimentos, como desinfetantes e como conservante de madeira e outros materiais. (EISLER, 1998). Sessenta e cinco por cento da produção desses compostos é destinada a aplicações na agropecuária, 28% na indústria como agente de flotação de minérios de sulfeto, refino de petróleo, mordente para corantes têxteis, galvanoplastia, conservante de madeiras e tintas anti-incrustantes e 7% são intencionalmente, jogados em corpos d'água para tratamentos de purificação. Alguns outros usos interessantes incluem o DIU (dispositivo intra-uterino) que é um artefato de



polietileno que pode ser adicionado a cobre ou hormônios e, quando inserido na cavidade uterina exerce função contraceptiva (TREIMAN et al., 1995). Tais dispositivos contêm cerca de 100 a 150 mg de cobre. A utilização de ligas que usam cobre associado a outros metais como alumínio, cobalto, manganês, níquel e zinco na fabricação de pontes e coroas dentárias (PEDROZO & LIMA, 2001).

A exposição ao cobre é inevitável uma vez que ele é um metal abundante na crosta terrestre. Mesmo por fontes naturais, a erosão e lixiviação liberam quantidades significantes em forma de poeira que se depositam na superfície terrestre e em águas superficiais, principalmente. As fontes naturais de exposição ao cobre incluem poeira levada pelo vento, vulcões, vegetação em decomposição, incêndios florestais e névoas marinhas. Os ventos, por possibilitarem a movimentação do metal depositado no solo da superfície terrestre, chegam a distribuir cerca de 65% do cobre emitido por fontes naturais. A atividade vulcânica também injeta partículas na atmosfera que podem se distribuir por terra ou em águas superficiais. Como qualquer outro metal é também distribuído por precipitações e fluxo de águas. Emissões antropogênicas incluem usinas, fundição de ferro, fontes de combustão, como queima de carvão para incineradores e geração de energia, mas principalmente, sobrecarga de minas de cobre e dejetos humanos e animais. Como exemplo, efluentes e esgotos tem concentrações de metais que variam enormemente. O lodo de esgoto, estritamente urbano, tem normalmente baixas quantidades de metais, mas quando esgotos industriais e água da chuva entram no sistema de captação de esgoto, este pode ter as concentrações de metais aumentadas, representando um risco ao meio ambiente e à saúde pública (OLIVEIRA & MATIAZZO, 2001). O acúmulo de metais pesados em solos agrícolas, devido às aplicações sucessivas de lodo de esgoto, causa preocupação com relação à segurança ambiental necessária para a implementação desta prática. Os metais expressam o potencial poluente diretamente nos organismos do solo, pela disponibilidade às plantas em níveis fitotóxicos, além da possibilidade de transferência para a cadeia alimentar através das próprias plantas ou pela contaminação das águas de superfície e subsuperfície (CHANG et al., 1997). A utilização agrícola (fertilizantes, biocidas e suplementos alimentares) de produtos de cobre é responsável por 2% do cobre lançado no solo (IPCS, 1998). A utilização de resíduos sólidos, como o lixo doméstico e o procedente da agricultura em processos de compostagem são fontes relevantes de metais, sendo o lixiviado oriundo desses

processos ricos em metais como o cobre (GROSSI, 1993). Outras fontes de exposição ao cobre significativas e curiosas consistem no cobre oriundo de tubulações o que pode elevar sua concentração no sistema público de abastecimento de água dependendo da acidez, dureza da água, temperatura, conteúdo de  $\text{CO}_2$  dissolvido, duração do contato água - tubulação, idade e extensão da tubulação de cobre ou peças hidráulicas feitas com ligas desse minério (BARCELOUX, 1999). O uso de cobre na cobertura de telhados pode também favorecer a contaminação das águas através da lixiviação. Nesses casos o volume de precipitação, a maior exposição à ação dos ventos e a menor inclinação em relação ao horizonte são fatores determinantes de uma maior ou menor lixiviação (WALLINDER et al., 2000).

Apesar de ter sido estimado que 66% das emissões de cobre para o ambiente em 1983 foram provenientes de fontes antrópicas (IPCS, 1998) a quantidade anual que entra no ecossistema global é desconhecida, entretanto as estimativas variam de 75.000 toneladas (MOORE et al., 1997) a 1,8 milhões de toneladas (NAS, 1977). Disso, 80,7% do cobre produzido é depositado nos compartimentos terrestre, 15,7% na hidrosfera, e 3,6% para a atmosfera (NRIAGU, 1979). A entrada de cobre nos ecossistemas aquáticos aumentou acentuadamente nas últimas décadas, pois os recursos hídricos têm sido utilizados como locais para o despejo dos resíduos provenientes das atividades antropogênicas e, pensava-se que esses ecossistemas tinham capacidade infinita de absorver poluentes. O problema é que a diluição não é de maneira alguma uma solução para a poluição (MELA, 2004).

### 1.3 Cobre: Propriedades químicas e bioquímicas

Como classificação, o cobre é um elemento químico de símbolo Cu número atômico 29 (29 prótons e 29 elétrons) e de massa atômica 63,6. Dito um metal de transição, pertence ao grupo 11 (1B) da Classificação Periódica dos Elementos. À temperatura ambiente, o cobre encontra-se no estado sólido. Tem ponto de ebulição de  $2595^\circ\text{C}$  e fusão a  $1083^\circ\text{C}$ , apres enta densidade relativa de 8,9, em forma nativa não é solúvel em água ou em soluções salinas, porém é solúvel em soluções ácidas na presença de um agente oxidante como o ácido nítrico. O cobre apresenta quatro estados de oxidação: metálico  $\text{Cu}^0$ , íon cuproso  $\text{Cu}^+$ , íon cúprico  $\text{Cu}^{+2}$  e íon trivalente  $\text{Cu}^{+3}$ . Possui dois isótopos estáveis,  $^{63}\text{Cu}$  e  $^{65}\text{Cu}$ , com

abundância na natureza de 69,17% e 30,83% respectivamente, além de ter nove radioativos, de massa, 58, 59, 60, 61, 62, 64, 66, 67 e 68. Cristaliza no sistema cúbico e não possui formas alotrópicas. Não é atacado pelo ar seco, mas em ar úmido que contenha dióxido de carbono forma-se uma camada protetora esverdeada de hidroxicarbonetos e hidroixissulfatos protegendo-o contra posterior oxidação (PEDROZO & LIMA, 2001).

A forma físico-química do cobre determina seu comportamento no meio ambiente e disponibilidade na biota. O íon cuproso ( $\text{Cu}^{+1}$ ) é instável em solução aquosa na faixa de pH entre 6-8 dissociando-se rapidamente por auto-oxirredução em íon cúprico e elementar (PEDROZO & LIMA, 2001). Existe apenas em água, quando complexado, geralmente em uma forma tetraédrica, com afinidade para ligantes de enxofre e de nitrogênio (SCHROEDER et al., 1966 *apud* EISLER, 1998). Os poucos compostos cuprosos estáveis em água são aqueles extremamente insolúveis como o cloreto de cobre. O estado de oxidação mais importante no meio ambiente aquático ou *in natura* é o bivalente ( $\text{Cu}^{+2}$ ). Íons cúpricos são coordenados com seis moléculas de água em solução. Ele normalmente forma quelatos menos estáveis com ligantes de nitrogênio e oxigênio planares. Na água do mar e águas intersticiais, o íon cúprico livre é o mais biodisponível e tóxico das espécies inorgânicas, no entanto, a concentração de íons livres é sensível a complexação e está menos disponível para a biota aquática na presença de quelantes naturais orgânicos e de salinidade elevada (BRYAN & LANGSTON, 1992). Íons cúpricos são responsáveis por cerca de 1% do cobre total dissolvido em água salgada e menos de 1% em água doce (EISLER, 1998). O íon cúprico liga-se preferencialmente a ligantes inorgânicos como  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{CO}_3^{-2}$ ,  $\text{SO}_4^{-2}$  via oxigênio e a compostos orgânicos através de grupos fenólicos e carboxílicos. Esta forma pode ainda adsorver-se a vários óxidos metálicos hidratados, incluindo os de ferro, manganês e alumínio. Os compostos cúpricos são geralmente, solúveis em água e de coloração azul ou verde (IPCS, 1998; PEDROZO & LIMA, 2001). O cobre trivalente ( $\text{Cu}^{+3}$ ), provavelmente não ocorre naturalmente, apenas em alguns compostos. Ele é um forte oxidante, mas nenhum composto é considerado industrialmente importante ou ambientalmente significativo (EISLER, 1998; PEDROZO & LIMA, 2001).

Como ilustrado na Figura 1, vários processos influenciam o destino do cobre em meio aquoso. Estes incluem a formação de complexos a ligantes orgânicos e inorgânicos, a adsorção a óxidos de metal hidratado, argilas e materiais

orgânicos em suspensão, a bioacumulação e troca entre sedimentos e água (IPCS, 1998; PEDROZO & LIMA, 2001). Grande parte do cobre descarregado na água está na forma de partículas e tende a precipitar ou ser adsorvido por matéria orgânica, ferro hidratado, óxidos de manganês e argila no sedimento ou coluna de água. Informações sobre as formas físico-químicas da especiação de cobre são mais relevantes do que as concentrações de cobre total (IPCS, 1998).

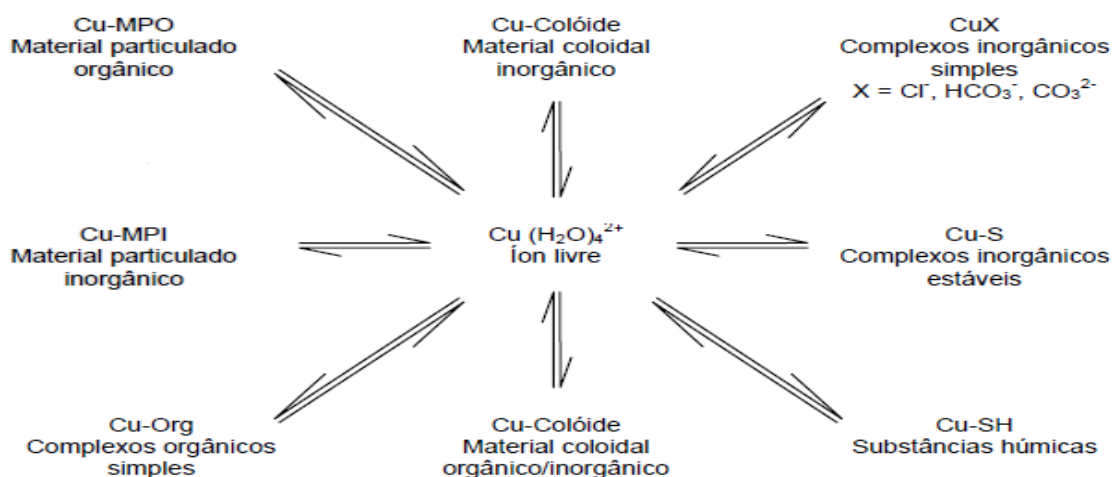


Figura 1: Esquema da distribuição e especiação do cobre em águas naturais. Adaptado a partir de Sodré (2005).

Assim, nota-se que a especiação não se restringe apenas à diferenciação entre estados de oxidação, mas também à distribuição de um elemento entre compostos orgânicos e inorgânicos de forma que possa afetar seu transporte, biodisponibilidade e, conseqüentemente, sua toxicidade (TEMPLETON et al., 2000). Desta maneira, o conhecimento da especiação de um metal representa o instrumento que mais subsidia a avaliação da toxicidade destas espécies. Devido à importância do conhecimento da especiação de metais em águas naturais, os padrões de qualidade de água nos Estados Unidos são baseados, há mais de quinze anos, na fração solúvel do metal, e não em sua concentração total (USEPA, 1992). Anteriormente, os padrões de qualidade de água para corpos receptores no nosso país eram fundamentados apenas na concentração total do metal (CONAMA, 1986). Atualmente, os padrões estão estabelecidos com base tanto na concentração total como na fração solúvel do metal na coluna de água (CONAMA, 2005). Essa mudança na lei foi considerada um avanço, pois, atualmente considera-se a informação obtida através da determinação da concentração total de um dado

elemento insuficiente do ponto de vista ambiental, por não traduzir a biodisponibilidade desse (SOARES, 1995). É relevante ainda dizer que a forma química de cobre em água doce é importante no controle de processos geoquímicos e biológicos (EISLER, 1998).

Em água doce, a solubilidade de sais de cobre é diminuída em condições de redução e ainda é modificado pelo tamanho e densidade dos materiais em suspensão, temperatura, dureza e principalmente o pH da água, como mostra a Figura 2. As principais espécies químicas de cobre solúvel encontradas na água doce são  $\text{Cu}(\text{CO}_3)_2^{-2}$  e  $\text{CuCO}_3$  (EISLER, 1998). O íon cúprico e algumas espécies de hidroxila de cobre são correlacionados com alta toxicidade à vida aquática, no entanto, as espécies de carbonato ( $\text{CuHCO}_3^+$ ,  $\text{CuCO}_3$ ,  $\text{Cu}(\text{CO}_3)_2^{-2}$ ) são muito menos tóxicas do que outros complexos de cobre (MEADOR, 1991).

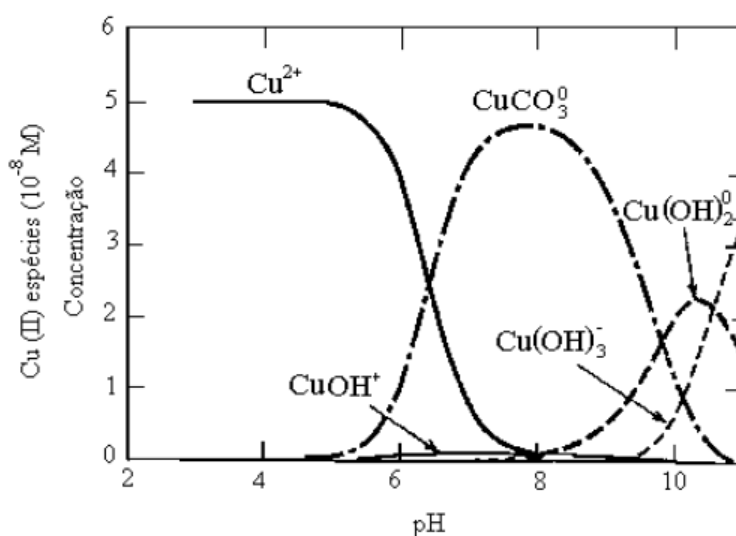


Figura 2: Especiação do cobre em função do pH. Retirado de (PEDROZO & LIMA, 2001).

A toxicidade do cobre geralmente decresce com o aumento da dureza da água, provavelmente pela competição entre cálcio e cobre pelos sítios de adsorção em superfícies biológicas. Assim, quanto maior a concentração de cálcio menor a adsorção de cobre (IPCS, 1998). O equilíbrio é alterado na presença de ácidos húmicos, ácidos fúlvicos, aminoácidos, cianetos, certos polipeptídios e detergentes (USEPA, 1980).

A maioria dos sais cúpricos dissolvem-se facilmente em água doce para produzir o íon aquoso,  $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6^{+2}$  (EISLER, 1998). Cloreto, nitrato e sulfato de cobre divalentes são altamente solúveis em água mas, carbonato de cobre, carbonato cúprico, hidróxido de cobre, óxido cúprico e sulfeto cúprico precipitam em

solução ou formam suspensões coloidais quando a concentração de um ânion em particular excede a solubilidade do sal. Os principais precipitados formados em águas naturais são a malaquita, o hidróxido de cobre e a azurita. Em águas com baixas concentrações de  $O_2$ , forma-se calcocita ( $Cu_2S$ ), óxido de cobre ( $Cu_2O$ ) e cobre metálico (PEDROZO & LIMA, 2001).

As concentrações de cobre nos sedimentos correlacionam-se positivamente com a concentração de cobre dissolvido na coluna de água sobrejacente e são usados para prever a toxicidade de sedimentos de água doce (ANKLEY et al. 1993). Em sedimentos, o cobre liga-se primeiramente a matéria orgânica na seguinte ordem: hidratos de óxido de manganês, matéria orgânica, óxidos de ferro hidratado, aluminossilicatos e argila. A presença de sulfetos solúveis em solução ácida fraca, comuns em águas doces e salgadas, denominados sulfetos ácidos voláteis (SAV) é um fator importante no controle da toxicidade de vários metais. A toxicidade dos metais não é observada quando estes se ligam ao sedimento e a concentração de SAV é maior que a soma da concentração molar dos metais presentes (IPCS, 1998). Um estudo de WINNER et al.(1990) demonstrou também que as comunidades aquáticas se tornam mais sensíveis à toxicidade do cobre durante a exposição de cinco semanas na primavera e não no verão ou no outono, porque na primavera as concentrações de carbono orgânico dissolvido são reduzidas.

O cobre exibe várias interações relevantes com outros metais. Nos animais, ele interage com metais essenciais, como ferro, zinco, molibdênio, manganês, níquel e selênio e também com elementos não essenciais incluindo a prata, cádmio, mercúrio e chumbo. As interações podem ser benéficas ou prejudiciais ao organismo (KIRCHGESSNER, 1979). Os padrões de acúmulo de cobre, o metabolismo e a toxicidade dessas interações frequentemente, diferem daquelas produzidas pelo cobre sozinho. O reconhecimento dessas interações é essencial para a compreensão da toxicocinética do cobre (EISLER, 1998). Como exemplo pode-se citar a interação de cobre e cádmio nos mamíferos, onde o cádmio inibe a absorção de cobre através da mucosa intestinal (AASETH & NORSETH, 1986). No caso do ferro, a adição dele na dieta de porcos domésticos aumenta a resistência à toxicidade do cobre, mas esse caso é considerado uma exceção entre os mamíferos (USEPA, 1980). O antagonismo entre cobre e zinco é amplamente conhecido, as concentrações séricas e hepáticas de cobre decrescem linearmente

conforme aumenta logaritmicamente as concentrações de zinco na dieta (PEDROZO & LIMA, 2001). Misturas de sais de cobre e zinco em peixes marinhos ou de água doce são aditivos de toxicidade, produzindo mais mortes em 96 horas do que o esperado com base em componentes individuais (EISLER & GARDNER, 1973). Em peixes, a toxicidade com metais não essenciais é aditiva, e ocorre com misturas de sais de cobre e mercúrio, cobre-zinco-fenol e de cobre-níquel-zinco (BIRGE & BLACK, 1979). Compostos orgânicos que também causam aumento de toxicidade do metal em questão são as misturas de cobre com detergentes aniônicos ou inseticidas organofosforados (EISLER, 1998).

Metabolicamente, o cobre é essencial na homeostase dos organismos e é parte de várias enzimas, incluindo a tirosinase envolvida na produção de melanina, a dopamina beta-hidroxilase relacionada à síntese de catecolaminas. A superóxido-dismutase com função de desintoxicação de radicais livres, ceruloplasmina, importante na regulação iônica do ferro e outros metais possivelmente e citocromo-c-oxidase, a última enzima da cadeia transportadora de elétrons, presente em todos os organismos aeróbicos (AASETH & NORSETH, 1986; MOORE, 1997). Assim sabe-se, que a utilização do cobre se deu cedo na evolução dos organismos, e é esperado certo grau de conservação das moléculas envolvidas no transporte do cobre. Como todos os metais essenciais, o cobre apresenta uma curva em forma de “U” que vai da deficiência e consequente morte, até o excesso que é tóxico e também pode ser uma eventual causa de morte (MOORE, 1997).

Em humanos, a anemia e neutropenia ocorrem na deficiência grave de cobre, e parte da explicação é a necessidade de cobre na ceruloplasmina que oxida  $\text{Fe}^{+2}$  a  $\text{Fe}^{+3}$  para ligação da transferrina (MOORE, 1997). Outro fato importante na deficiência desse metal é a doença de Menkes, de causa genética recessiva ligada ao cromossomo X, pode ser causa morte em crianças por deficiência na absorção de cobre. Nesta alteração genética, a transferência placentária de cobre é deficiente e a transferência de cobre no pequeno intestino delgado é muito ineficiente. Os efeitos fisiológicos são agravados pelo fato de que é necessário o gene em questão para o transporte do cobre através das camadas celulares do epitélio e organelas celulares, na maioria das células e na barreira hematoencefálica (MOORE, 1997). Já a doença de Wilson é um exemplo da toxicidade crônica do cobre em humanos, quando esse excede as concentrações consideradas aceitáveis no metabolismo. Assim, o cobre se acumula principalmente no fígado e no cérebro, causando mau

funcionamento desses órgãos (HARRIS & GITLIN, 1996; MOORE, 1997). Como os níveis da absorção de cobre da dieta não são afetados, a acumulação no fígado de forma constante culmina na morte dos hepatócitos (MOORE, 1997). As manifestações sistêmicas da doença de Wilson são lesões hepáticas e renais e anemia hemolítica (USEPA 1980; AASETH & NORSETH 1986; EISLER, 1998; ATSDR, 2004).

Os efeitos tóxicos do cobre de maneira geral são diversos, incluindo alterações da permeabilidade das membranas celulares. O principal alvo dos íons cúpricos nas membranas celulares são grupos tiol que reduzem o íon cúprico ( $\text{Cu}^{+2}$ ) para íon cuproso ( $\text{Cu}^{+1}$ ), há ainda a oxidação simultânea de dissulfetos na membrana. Íons cuprosos são reoxidados na presença de oxigênio molecular e este é convertido em radicais superóxido tóxicos ( $\text{O}^{-2}$ ), os quais induzem a lipoperoxidação (AASETH & NORSETH, 1986; EISLER, 1998).

Na biota aquática o excesso de cobre manifesta-se em diferentes grupos de maneiras diversas. Em gastrópodes, o cobre pode induzir secreção de muco pelas células caliciformes. Ele foi localizado no epitélio celular do pé (RYDER & BOWEN, 1977) e liga-se a regiões hidrofílicas das membranas externas das células epiteliais, alterando propriedades bioquímicas e biofísicas, perturbando o funcionamento normal da peroxidase e ferretina (CHENG, 1979). Nos caranguejos, as brânquias são um dos principais alvos da toxicidade do cobre. Ele causa a diminuição da afinidade do oxigênio com a hemocianina (TRUCHOT & BOITEL, 1992).

Em peixes o principal sítio receptor de metais são as brânquias onde o  $\text{Na}^{+1}$  e o  $\text{Ca}^{+2}$  são transportados da água para a circulação sanguínea por meio de bombas. O canal ou proteínas carreadoras associadas a essas bombas apresentam ligantes específicos carregados negativamente. Experimentos demonstraram relação entre a extensão das saturações dos sítios receptores nas brânquias e mortalidade (IPCS, 1998; PREDROZO & LIMA, 2001). Estudos mostram também que a superfície externa do epitélio branquial tem uma afinidade relativamente baixa para o cobre, permitindo a penetração dele pelos compartimentos intracelulares. O cobre prejudica a função das brânquias, ao alterar trocas iônicas transepiteliais, por exemplo, impede ou perturba o equilíbrio eletrolítico por captação ativa inibindo ou estimulando a perda passiva (REID & MCDONALD, 1991). Causas de morte são



relacionadas com a hipóxia do tecido, resultado de redução da atividade de enzimas regulatórias da síntese de ATP (HANSEN et al., 1992).

O cobre pode danificar ou destruir a capacidade de olfação de um peixe, levando-o à morte. Salmões, por exemplo, usam o senso olfativo para identificar predadores, presas, parentes e companheiros, a mistura e eventual engano de qualquer um desses eventos é prejudicial ou fatal (WOODY, 2007). Além disso, eles podem ter a migração afetada e conseqüentemente, a taxa reprodutiva pode decair. Esses peixes memorizam uma combinação complexa de odores químicos quando da migração da água doce onde nasceram à água salgada. Quando voltam ao habitat para desovar, eles seguem esses odores usando a combinação memorizada (HASLER & SCHLOTZ, 1983). Se o salmão não puder cheirar, ou se a assinatura química do habitat dos peixes mudarem, o retorno em seguida para a desova será inviabilizado, pois eles não reconhecerão o lugar onde nasceram (WOODY, 2007).

A dieta é a via mais importante de acumulação de cobre em animais aquáticos, e a escolha dos alimentos influencia a concentração de cobre no organismo (EISLER, 1998). A concentração de cobre em insetos aquáticos coletados em rios contaminados é maior em detritívoros (102 mg/kg de peso seco), seguida por predadores (54 mg /kg de peso seco) e onívoros (43 mg /kg de peso seco) (CAIN et al., 1992). Em ecossistemas onde estão inseridos salmonídeos, o cobre afeta desde consumidores primários até os predadores de topo. Isso acontece principalmente pela predileção dos salmões em alimentarem-se de zooplâncton que são severamente afetados pela toxicidade desse metal (WOODY, 2007). Concentrações letais e subletais de cobre mostram efeitos tóxicos do cobre na biota aquática em níveis menores que 9 µg/L (EISLER, 2000).

O cobre ou os compostos derivados do cobre em concentrações ambientalmente realistas parece não ser agentes causadores de carcinogenicidade ou teratogenicidade (USEPA 1980; AASETH & NORSETH, 1986; EISLER, 1998). No entanto, sob condições controladas de concentrações elevadas, estudos sugerem que o cobre é um potencial carcinogênico em roedores (USEPA 1980). Além de que, dados levantados entre trabalhadores de minas de extração de cobre constataam que o risco de câncer aumentou com o tempo de trabalho desde a primeira exposição (ATSDR, 2004). Pode ser mutagênico em roedores (AASETH & NORSETH, 1986) e teratogênico em peixes (BIRGE & BLACK, 1979).

#### 1.4 Cloreto de cobre

O cloreto de cobre é um composto químico inorgânico de forma molecular  $\text{CuCl}_2$ . Existe em diferentes formas dependendo da sua hidratação. Como anidro ele é conhecido por erioalcita. O nome tem origem do grego, "erion" que significa lã e "kalcos" cobre, uma alusão a forma de agregação do material coletado na área do vulcão Vesúvio, Itália. Na forma dihidratada ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), a qual foi usada neste trabalho, ele é classificado como sal inorgânico de aparência sólida em grânulos, cristais, microcristais ou pó. A cor varia do azul ao verde, quando em presença de umidade e ocorrem variações até a coloração marrom escuro quando exposto à luz e é inodoro. Segundo dados da ficha de informações de segurança do produto químico, tem como propriedades físicoquímicas peso molecular de 170,48, o pH em solução aquosa a 25% é estimado em 3,6, o pontos de fusão é 110 °C e de ebulição 150 °C, tem densidade relativa de 2,51. É solúvel em água e em metanol e não é inflamável.

Pode ser encontrado na natureza, porém é raro. A sua formação depende de condições do ambiente e geoquímicas muito particulares como alta evaporação, pequena umidade relativa do ar e continuo suplemento de Cl e Cu dos lençóis freáticos (BEA, et al., 2010). Sendo assim não é um mineral muito explorado na indústria, devido às poucas jazidas existentes. Os principais lugares de ocorrência são como incrustações em torno de fumarolas no Vesúvio, Itália, na Rússia a partir da fissura do vulcão Kamchatka e como produto de intemperismo em clima árido num depósito de sulfato de cobre em Quetena, Chile. Neste último lugar ele ocorre como implantações na superfície de rochas em forma de líquens (PALACHE & FOSHAG, 1938). Outras localidades também são importantes como, na mina de exploração de cobre Mt. Gunson, Stuart Shelf e Moonta no sul da Austrália e Hawthorne no estado de Nevada, Estados Unidos. Ele apresenta associações com outros minerais dependendo da localidade. No Vesúvio, por exemplo, encontra-se com melanotalita, calcocianita, euclorina e dolerofanita (ANTHONY et al., 2005).

Este sal é muito usado como desinfetante, na preservação de madeiras, desodorante e dessulfurizante em destilados de petróleo, em fotografia, na purificação de água, como aditivo alimentar e também é biocida (PEDROZO & LIMA, 2001).

Os fungicidas cúpricos estão entre os primeiros biocidas utilizados no mundo e ainda hoje são amplamente aproveitados na agricultura (MENKISSOGLU & LINDOW, 1991). O oxicleto de cobre em particular, é muito usado em pulverizações e é encontrado no mercado com diversas formulações como, por exemplo, o conhecido fungicida- bactericida Agrinose, o Reconil, o Fungitol Verde, Iperion WG, entre outros. Existem inúmeros relatos de fitotoxicidade causada pela sua administração. PEREIRA et al. (2008) estudou o desempenho do composto em questão e constatou que, mesmo ele sendo o mais indicado para o tratamento de doenças de natureza fúngica em maçã, maracujá, caqui e goiaba ele causa fitotoxicidade e não tem resultados relevantes no controle do *C. gloeosporioides*, fungo por ele estudado. Extrema fitotoxicidade foi constatada no estudo com cultivo de milho e controle da doença foliar, mancha branca do milho, causada pela bactéria *Pantoea ananatis* (PINTO & FERNENDES, 1993). Além de que, há várias descrições na literatura sobre a pouca eficácia desse tipo de tratamento, principalmente pela ocorrência frequente de estirpes patógenas a vegetais resistentes aos compostos cúpricos (PERNEZNY, 2007). Em REIS & TEODORO (2000), constatou-se que os resíduos de oxicleto de cobre em cafeeiros têm efeito positivo sobre a reprodução do ácaro *Oligonychus ilicis*, ocorrendo um aumento na postura de ovos com o aumento da dosagem, concluindo-se que esse efeito é uma das causas de surtos do ácaro em cafezais.

O mecanismo de ação tem por fator crítico o alto potencial de oxidação catalítica e de redução que permite aos íons de cobre alterarem as formas das proteínas fazendo com que elas já não possam realizar suas funções normais (INTERNATIONAL COPPER ASSOCIATION, 2010). Assim, ele também influencia a atividade da peroxidase e da catalase, a qual é reduzida sob alto teor de cobre, fato que resulta no acúmulo de peróxidos (ZAMBOLIN & VENTURA, 1996 *apud* TOMAZELA et al. 2006). O cloreto de cobre também interfere na importação de proteínas para o cloroplasto, ele oxida reversivelmente grupos tiol e inibe quase completamente a ligação da proteína e o subsequente transporte para o interior da organela (SEEDORF & SOLL, 1995).

Como purificador de água, os sais de cobre são usados no controle de floração de algas. Eles eram usados no Brasil em concentrações que variavam de estação para estação e não raramente ultrapassavam as quantidades estipuladas por lei, sendo ele um responsável em potencial pela morte e consequente, liberação

de toxinas pelas cianobactérias (SCHUBERT et al., 2003). Tal prática acabou sendo proibida por lei e atualmente, a portaria n<sup>o</sup> 518, de 25 de março de 2004, emitida pelo Ministério da Saúde estipula a norma de Controle e Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano e seu padrão de Potabilidade. No segundo parágrafo consta: “É vedado o uso de algicidas para o controle do crescimento de cianobactérias ou qualquer intervenção no manancial que provoque a lise das células desses microrganismos, quando a densidade das cianobactérias exceder 20.000 células/ml (ou 2mm<sup>3</sup>/L de biovolume), sob pena de comprometimento da avaliação de riscos à saúde associados as cianotoxinas”. Em algas, o cobre inibe a fotossíntese, fixação biológica de nitrogênio, e absorção de fósforo (EISLER, 1998).

Outro uso do CuCl<sub>2</sub> devido suas propriedades biocidas é como poderoso desinfetante. As soluções de cloreto de cobre têm eficácias antimicrobianas similares aos desinfetantes e aos produtos químicos esterilizantes que se utilizam na indústria dos equipamentos médicos. Para os consumidores, o cobre é um ingrediente ativo em enxágues bucais, creme dental e medicamentos (INTERNATIONAL COPPER ASSOCIATION, 2010)

Como aditivo alimentar ele é usado em doses bastante altas nas dietas de frango de corte (MORAIS et al., 2001), mas principalmente em leitões recém desmamados (LIMA & MIYADA, 2003). As concentrações na dieta podem conter até 250 mg/kg de cobre (USEPA 1980). A ação antimicrobiana e modificadora da flora do trato gastrointestinal é amplamente discutida (ZHOU et al., 1994; APGAR et al., 1995) e sugeriram que o Cu pode ter uma ação metabólica ou sistêmica na promoção do crescimento de leitões recém desmamados. O uso do cobre como promotor do crescimento pode se justificar em função do baixo custo em relação aos demais agentes antimicrobianos. Porém, vários países, sofrem restrições quanto ao uso de níveis subterapêuticos de aditivos antimicrobianos em dietas de suínos, devido à possibilidade do desenvolvimento de resistência bacteriana aos antibióticos e quimioterápicos (LIMA & MIYADA, 2003).

### 1.5 Bioindicador: *Rhamdia quelen*



Figura 3: Exemplar de *Rhamdia quelen*

O *Rhamdia quelen* (QUOY & GAIMARD, 1824) ilustrado na Figura 3, é conhecido, popularmente, como jundiá pertence à Classe Osteichthyes, Série Teleostei, Ordem Siluriformes e Família Pimelodidae. SILFVERGRIP (1996) revisou a sistemática do gênero *Rhamdia*, pois era confusa desde que foi primeiramente descrita, sendo este gênero formado por apenas 11 espécies e não pelas 100, anteriormente consideradas. Ele tem distribuição neotropical, do sudeste do México ao norte, até o centro da Argentina ao sul, ocorrendo em todo o Brasil (SILFVERGRIP, 1996). Morfologicamente, o jundiá possui boca sem dentes, maxila superior pouco mais longa que inferior e corpo sem escamas, possui barbilhões de forma cilíndrica com comprimento variado. A cor varia do marrom escuro, dourado até uma coloração preta, apresenta algumas manchas mais escuras espalhadas pelo corpo e ventralmente tem coloração clara. Podem atingir 50 cm de comprimento e 3 kg de peso. Vive em lagos e poços fundos dos rios, preferindo os ambientes de águas mais calmas com fundo de areia e lama, junto às margens e vegetação. Escondem-se entre pedras e troncos apodrecidos. São esteno-hialinos e euritérmicos (GOMES et al., 2000). Possuem maior atividade alimentar no período noturno (PIAIA et al., 1999). Onívoros, com uma clara preferência por peixes, crustáceos, insetos, restos vegetais, e detritos orgânicos, os organismos encontrados no conteúdo gastrintestinal de *R. quelen* não são restritos ao habitat bentônico indicando que essa espécie é generalista com relação à alimentação (GUEDES, 1980). A maturidade sexual é atingida por volta de um ano de idade nos

dois sexos e possui dois picos reprodutivos por ano (no verão e na primavera); a espécie não possui cuidado parental (GOMES et al., 2000).

As características particulares desse peixe de resistência ao manejo pela facilidade de reprodução e larvicultura, crescimento acelerado, inclusive nos meses mais frios, boa eficiência alimentar levaram ao aumento de sua criação (CARNEIRO et al., 2002). Além de apresentar grande aceitação pelo mercado consumidor devido à carne saborosa e ausência de espinhos intramusculares (CARNEIRO & MIKOS, 2005).

O uso de peixes como organismos sentinelas é muito importante tanto pela posição desses organismos na cadeia trófica e o alto valor comercial agregado quanto, pela logística (custo, manutenção, acondicionamento, transporte e espaço).

## 1.6 Biomarcadores

Avaliar a toxicidade e o impacto de potenciais poluentes ao meio ambiente com estudos macroecológicos de populações e comunidades é complexo, sendo que os efeitos observáveis tendem a se manifestar após longos períodos de exposição. Além disso, as situações identificadas são distúrbios ecológicos muito graves e praticamente irreversíveis como perda de biodiversidade, destruição do habitat e declínio populacional (MOORE et al., 2004). Assim o uso de biomarcadores como mostra a Figura 4 é o meio mais efetivo para prever efeitos adversos de poluentes em geral.

Biomarcadores são definidos pela Academia Nacional de Ciências (National Academy of Sciences) dos Estados Unidos como “variações em compostos celulares ou bioquímicos ou processo, estruturas ou funções induzidos por um xenobiótico que são mensuráveis num sistema biológico”. Muitas definições para esse termo foram propostas e são muitas também as discussões sobre a melhor definição. O uso de biomarcadores dá informações sobre os efeitos biológicos dos poluentes em vez de apenas quantificar seus níveis no meio ambiente (VAN DER OOST et al., 2003).

Existem duas categorias para classificação de biomarcadores, os de efeito e os de exposição. Biomarcadores de exposição indicam apenas se ocorreu ou está ocorrendo exposição nociva à poluentes sobre o indivíduo analisado, sem permitir qualquer inferência a respeito do grau de efeitos adversos causados. As

metalotioneínas podem ser citadas como exemplo. No entanto, biomarcadores de efeito demonstram a ocorrência de toxicidade no organismo em questão. Geralmente, as alterações bioquímicas podem ser consideradas marcadores tanto de exposição como de efeito (GUILOSKI, 2009).

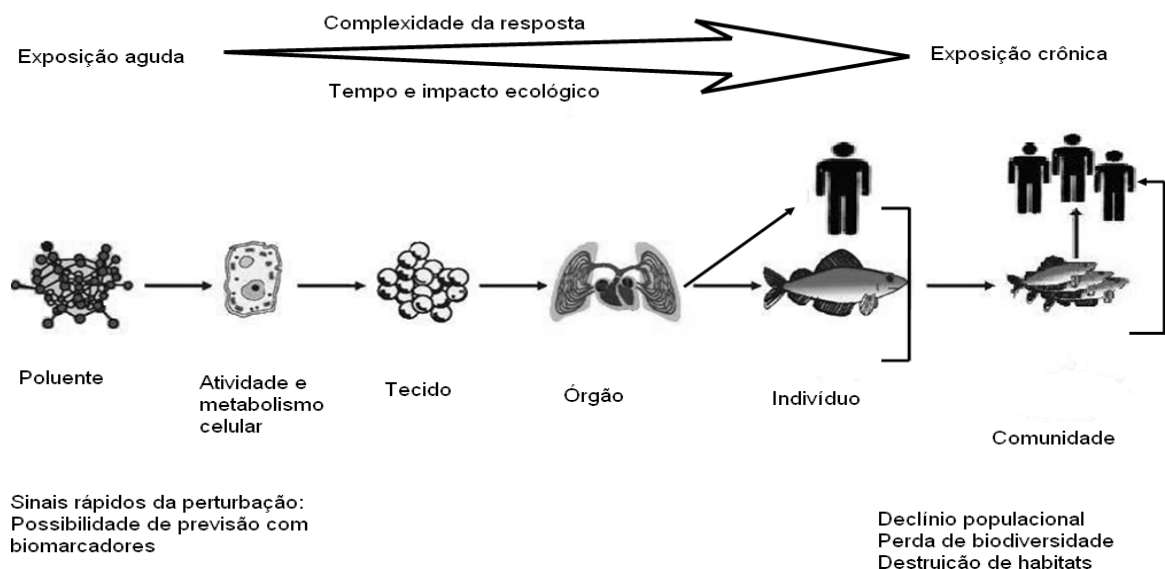


Figura 4: Resposta dos organismos à poluição ambiental. Agentes biológicos mais simples possuem rápida resposta à perturbação (biomarcadores), com capacidade de previsibilidade, fundamental para estudos ecotoxicológicos. Adaptado de Trevisan (2005)

Neste estudo analisaremos as atividades de enzimas relacionadas à biotransformação, ao estresse oxidativo e danos de membrana no tecido hepático e à neurotoxicidade no tecido muscular e cerebral. Também serão considerados análises morfológicas e danos histopatológicos do tecido hepático devido sua grande importância na biotransformação de tóxicos e excreção de alguns metais pesados.

#### 1.6.1 Biomarcadores de Biotransformação

A biotransformação é uma etapa importante na desintoxicação e eliminação de substâncias nocivas. Este processo normalmente dá origem a metabólitos finais mais hidrossolúveis. O fígado é o órgão principal onde ocorre a biotransformação de xenobióticos na maioria dos animais, mas as enzimas existem em quase todos os órgãos, como nos tecidos situados nas principais vias de entrada, como trato gastrointestinal, pele, pulmão e mucosa nasal (ROCHA, 2004).

Alterações nos níveis de atividade das enzimas de biotransformação são consideradas muito sensíveis e por isso, empregadas como biomarcadores de biotransformação (PAMPLONA, 2009).

As fases da biotransformação são separadas em I e II. Na fase I podem ocorrer oxidação, redução e hidrólise. A primeira fase fornece os grupos funcionais que possibilitam as reações da próxima fase. As reações de fase II podem ser precedidas ou não pelas de fase I, e incluem glicuronidação, sulfatação, acetilação, metilação, conjugação com glutathione, aminoácidos e ácidos graxos (PARKINSON, 2001; ROCHA, 2004).

#### 1.6.1.1 Glutathione S-transferase (GST)

A glutathione S-transferase (GST) representa uma importante família de isoenzimas pertencentes à fase II. São multifuncionais, diméricas e estão presentes no citosol de células e tem papel como catalisadoras da conjugação do tripeptídeo glutathione reduzido (GSH) com vários compostos eletrofílicos oriundos da fase I (CLEMENTE, 2009).

Além da importância no transporte intracelular e biossíntese de leucotrienos e prostaglandinas, a função importante das GSTs é a defesa do DNA e lipídios contra o dano oxidativo (VAN DER OOST et al., 2003) ligando-se covalentemente a compostos eletrofílicos, as GSTs reduzem a probabilidade desses compostos se ligarem a outras moléculas celulares, como o DNA (HUGGETT et al., 1992). Assim, a toxicidade de muitos compostos exógenos pode ser modulada pela indução da atividade da GST (VAN DER OOST et al., 2003).

Algumas isoformas de GST podem também combater o dano por estresse oxidativo pela atividade peroxidase dependente de GSH, enquanto outras isoformas conjugam aldeídos  $\alpha$ - $\beta$  insaturados reativos produzidos durante peroxidação da membrana lipídica (LIEBLER & REED, 1997; TRUTE et al., 2007).

#### 1.6.2 Biomarcadores de Estresse Oxidativo

O oxigênio é fundamental para os organismos aeróbios, porque é utilizado na produção de energia através da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria dos eucariotos, ou na membrana celular de muitas bactérias, além da essencialidade em várias vias metabólicas. Porém, seu consumo gera substâncias



tóxicas intra e extracelulares. Pode-se então afirmar que existe certo paradoxo nessa questão do oxigênio, pelo balanço existente entre suas vantagens e desvantagens e a inerência dessa molécula a vida aeróbica (TREVISAN, 2008).

Assim, a maioria do oxigênio molecular consumido pelos animais é reduzida à água, acoplada à oxidação de alimento e produção de energia como, por exemplo, durante o transporte de elétrons, reações enzimáticas, reações de auto-oxidação, ou ainda, pelo grupo heme de proteínas. A redução parcial resulta na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou oxiradicais e compreendem espécies radicais ou não radicais, como exemplo, o peróxido de hidrogênio. Os radicais livres são definidos como moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados. As formas de EROs incluem radical ânion superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxil ( $OH^\cdot$ ), radical peroxil ( $RO_2^\cdot$ ), radical alcóxil ( $RO^\cdot$ ) e radical hidroperoxil ( $HO_2^\cdot$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), peroxinitrito ( $ONOO^-$ , espécie reativa de nitrogênio) (NORDBERG & ARNÉR, 2001; LIVINGSTONE, 2001; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

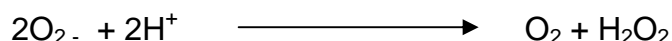
As EROs são continuamente produzidas, e podem reagir com grande gama das biomoléculas e danificar lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (CLEMENTE, 2009). Entretanto, papéis fisiológicos benéficos das EROs foram já descritos, como na sinalização intracelular e regulação do estado redox (NORDBERG; ARNÉR, 2001) controle da ventilação respiratória, apoptose, diferenciação e desenvolvimento celular, aderência de leucócitos a células endoteliais ou mesmo na ativação da resposta imunológica específica contra patógenos no processo inflamatório (DRÖGE, 2002).

A taxa de produção de EROs pode elevar-se na presença de diversos xenobióticos, como contaminantes ambientais (LIVINGSTONE, 2001), tornando-os importantes em estudos de toxicologia. Vários mecanismos de defesa celular existem para prevenir danos causados por EROs. Eles podem ser desintoxicados dos organismos por defesas antioxidantes como a vitamina C e glutathione reduzida ou enzimas antioxidantes específicas como superóxido-dismutase, catalase e glutathione-peroxidase. Entretanto, quando há desequilíbrio na produção dessas moléculas EROs e os sistemas antioxidantes pode acontecer uma situação denominada estresse oxidativo (LIVINGSTONE, 2001). O estresse é definido como uma condição em que o equilíbrio dinâmico do organismo, chamado de homeostase, é ameaçado ou perturbado como resultado das ações de estímulos intrínsecos ou

extrínsecos, comumente definidos como estressores (WENDELAAR BONGA, 1997). Este pode ocorrer devido à ação de poluentes, na alteração da regulação redox celular, pelo metabolismo do citocromo P450, ou ainda, pela presença de íons metálicos livres, gerando ciclos de reações oxidativas (REGOLI et al., 2002).

#### 1.6.2.1 Superóxido Dismutase (SOD)

A SOD é uma metaloenzima que desempenham papel antioxidante central, tem grande importância, pois é observada em todos os organismos aeróbicos. Age sobre o radical  $O_2^-$ , dismutando-o a  $H_2O_2$  e protegendo em até 97% os alvos do ataque do ânion superóxido (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).



Existem diferentes formas de SOD que podem variar quanto a sua estrutura e localização. Em eucariotos são encontradas duas principais isoformas, no citosol principalmente, mas também pode estar presente nos lisossomos, peroxissomos, núcleo e espaço intermembranoso das mitocôndrias na forma SOD-CuZn (possui cobre e zinco em seu sítio ativo), enquanto que na mitocôndria a forma SOD-Mn, com manganês em seu sítio ativo (HERMES- LIMA, 2004; TREVISAN, 2008).

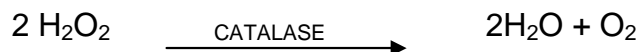
Essa enzima demonstra grandes diferenças quanto à atividade entre tecidos e espécies de peixes, tendo maior atividade nos marinhos, em comparação com peixes de água doce (WILHELM FILHO, 1996). Os peixes herbívoros também apresentam maior atividade dessa enzima (LACKNER, 1998).

Em relação à presença de contaminantes, vários trabalhos mostram que a atividade da SOD tende a ser maior em peixes expostos a poluentes, assim a atividade dessa enzima pode ser usada para mensuração de efeitos adversos resultantes da exposição. Ela é induzida muito rapidamente, dentro de poucas horas, especialmente se a produção de EROs não for muito alta (VAN DER OOST et al., 2003).

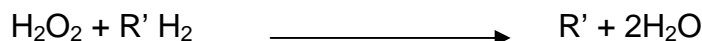
#### 1.6.2.2 Catalases (CAT)

As catalases (CAT) são enzimas que tem um grupamento heme, localizadas principalmente nos peroxissomos de células eucarióticas. Catalisam a

eliminação de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), liberando como produtos água e oxigênio molecular (VAN DER OOST et al, 2003). A reação predominante depende da concentração de doadores de H e da concentração ou taxa de produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no sistema. Entretanto, enquanto a reação peroxidativa é relativamente lenta, a decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  ocorre rapidamente (AEBI, 1984; VENTURA 2004)



As catalases também atuam na desintoxicação de diferentes substratos na oxidação de doadores de H como, como fenóis e alcoóis, via redução acoplada de peróxido de hidrogênio:

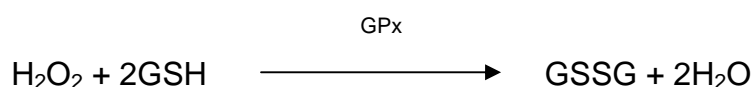


Uma das funções antioxidantes da catalase é reduzir o risco da formação do radical hidroxil a partir da  $\text{H}_2\text{O}_2$  via reação de Fenton, catalizada por íons de cobre e ferro (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

Vários poluentes, incluindo drogas hipolipídicas, herbicidas, inseticidas, lubrificantes, são conhecidos como indutores da proliferação de peroxissomos no fígado de mamíferos. Entretanto, a proliferação de peroxissomos pode mostrar diferentes efeitos sobre cada enzima encontrada nessa organela, podendo suas atividades estar ou não elevadas (FASHIMI & CAJARAVILLE, 1995).

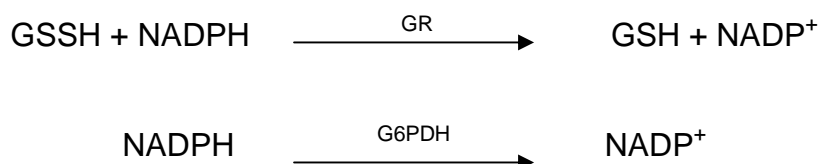
#### 1.6.2.3 Glutathione Redutase (GR)

Para entender a atividade da GR é necessário saber que durante o processo catalisado pela glutathione peroxidase (GPx), enzima responsável também pela eliminação de peróxidos, ocorre a oxidação da glutathione. A GPx catalisa a redução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$ , utilizando glutathione, na sua forma reduzida (GSH), como substrato:



Assim, a relação da concentração entre GSH/GSSG precisa ser elevada para a manutenção do poder redutor intracelular (KAPPUS, 1987). Nas células

normais isto ocorre pela presença de enzimas acessórias como a glicose-6 fosfato desidrogenase (G6PDH) e GR, as quais fornecem os co-substratos NADPH e GSH, respectivamente, necessários para o funcionamento do sistema de defesa celular contra o estresse oxidativo (VENTURA, 2004).



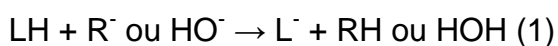
Para evitar a depleção da GSH e aumento da GSSG, a glutathione redutase reduz a GSSG à custa de NADPH, regenerando a GSH e mantendo desta forma o estado redox intracelular. A enzima G6PDH não deixa de estar envolvida com as defesas antioxidantes, pois fornece os equivalentes redutores NADPH para regeneração de GSSG (TREVISAN, 2008).

Aumentos nos níveis de atividade dessa enzima indicam aumento da formação de radicais. Sendo a GR um biomarcador sensível a variação na homeostase do indivíduo.

#### 1.6.2.4 Lipoperoxidação (LPO)

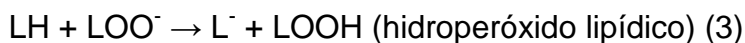
O processo de lipoperoxidação (LPO), ou oxidação de lipídios tem grande potencial como biomarcador de estresse oxidativo. Porque a oxidação de ácidos graxos polinsaturados é uma importante consequência do estresse oxidativo. Ele ocorre por uma cadeia de reações envolvendo três etapas distintas: iniciação, propagação e terminação. Iniciada pela abstração de um átomo de hidrogênio de um grupo metil ( $\text{-CH}_2$ ) de um ácido graxo polinsaturado através do ataque de uma molécula reativa, como ERO, metais, ou outros radicais livres, formando um radical de carbono. Oxiradicais, particularmente  $\cdot\text{OH}$ , podem realizar essa abstração (VAN DER OOST, 2003).

Início da peroxidação lipídica:



LH = lipídeo polinsaturado

Propagação da lipoperoxidação:



O término da peroxidação lipídica é o resultado da interação de radicais lipídicos e/ou formação de espécies não radicais por radicais lipídicos peroxil. Entre os produtos finais formados durante o processo de lipoperoxidação, destacam-se gases de hidrocarbonetos e os aldeídos, como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). O LOOH resultante pode facilmente se decompor em espécies reativas, sendo muitos desses agentes tóxicos e mutagênicos. As membranas lipídicas peroxidadas tornam-se rígidas e perdem sua permeabilidade e integridade (SEVANI & MCLEOD, 1997; VALAVANIDIS et al., 2006).

#### 1.6.3 Biomarcador de Neurotoxicidade – Acetilcolinesterase (AChE)

As enzimas usadas como biomarcadores de neurotoxicidade são as colinesterases. Dois tipos são identificados nos vertebrados, a acetilcolinesterase (AChE), e a butirilcolinesterase (BChE), conhecida como esterase não específica ou pseudocolinesterase. O cérebro de peixes tem AChE, mas não BChE, mas em músculos encontram-se ambas, AChE e BChE (VAN DER OOST et al., 2003) porém, assume-se que a AChE seja a mais representativa nesses tecidos. A AChE é essencial para a neurotransmissão colinérgica.

Essa enzima é a responsável pela degradação da acetilcolina, um neurotransmissor, o produto gerado é colina e ácido acético com liberação de um próton. Assim, enquanto diminui a quantidade de neurotransmissor, diminui também o potencial pós-sináptico (SHIMIDT-NIELSEN, 1996), esse mecanismo previne a passagem contínua de impulsos nervosos, vital para o normal funcionamento do sistema nervoso. Não ocorrendo degradação de acetilcolina, já foram observados efeitos comportamentais como hiperatividade, asfixia e morte (ROEX, et al., 2003). A hidrólise ocorre logo após a ligação acetilcolina-receptor, sendo o receptor nicotínico da membrana pós-sináptica seu alvo. Isso desencadeia a abertura de

canais de íons  $\text{Na}^+$ , e a posterior despolarização da membrana, o que causa um potencial de ação, e permite a propagação do impulso.

Se ocorrer a inibição da enzima que degrada a acetilcolinesterase acontece o bloqueio na transmissão de impulsos nervosos, isso porque ocorre a sobreposição dos impulsos causados pela permanência dos canais de  $\text{Na}^+$  abertos. Resultando na paralisação dessa função vital inerente dos organismos (STENESH, 1998).

Essa importante informação sobre a inibição das colinesterases foi proposta como biomarcador específico para organofosforados e carbamatos durante a década de 50 (WEISS, 1958), pois eles são inibidores específicos do sítio de ligação da AChE. Porém, nas últimas décadas tem sido relatada a inibição das colinesterases em várias espécies por outros contaminantes ambientais que não os supracitados (GUILHERMINO et al., 2000; MONTSERRAT et al., 2007). Os metais foram provavelmente à primeira classe de poluentes ambientais incluída como agentes anticolinesterásicos.

#### 1.6.4 Histopatologia

Alterações histopatológicas resultam de mudanças bioquímicas e fisiológicas no organismo. Essas mudanças podem levar a formação de lesões nas células, nos tecidos ou órgãos, assim, elas representam uma integração dos efeitos cumulativos dos estressores (HINTON et al., 1992; MYERS & FOURNIE, 2002). A histopatologia é considerada uma ferramenta útil e interessante que pode indicar e quantificar os efeitos resultantes da exposição a estressores nos indivíduos, representando um nível intermediário de organização biológica.

Como o fígado é o principal órgão e a maior glândula de metabolismo de xenobióticos nos vertebrados, e tem a capacidade de acumular diversas substâncias ele é um órgão de grande relevância como biomarcador e, conseqüentemente no estudo da toxicologia. Além de atuar na biotransformação de xenobióticos, é responsável pela excreção de alguns metais pesados, tem como funções também a estocagem de glicogênio e, especialmente em ciclostomados e peixes, acumula lipídeos. Produz a maioria do vitelo transferido aos óvulos e pode ter função hematopoiética, libera substâncias envolvidas na coagulação sanguínea, processa ou estoca vitaminas, está envolvido com o metabolismo de hormônios esteróides e

produz a bile (HEATH, 1995; POUGH et al., 1999; MELA, 2004). As principais células do fígado, os hepatócitos, são células poliédricas com um ou dois núcleos grandes, esféricos e centralmente localizados, com nucléolo evidente.

Ele é um órgão altamente recomendável como indicador para contaminação com metais pesados. EVANS et al. (1993) e AL-YOUSOUF et al. (2000) descreveram que este órgão tem papel importante na estocagem, redistribuição, desintoxicação e transformação de metais traços como o cobre, zinco e manganês, além de ser um sítio importante de alterações patológicas causadas por esses contaminantes.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Analisar o efeito tóxico do cloreto de cobre sobre peixes da espécie *Rhamdia quelen* com o uso de biomarcadores histopatológicos e bioquímicos.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o uso de biomarcadores bioquímicos para detecção de efeitos tóxicos nos peixes expostos ao contaminante.
- Avaliar, através de análises histopatológicas, o efeito do cloreto de cobre no fígado do jundiá, utilizando microscopia de luz.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Desenho experimental

Os peixes da espécie *Rhamdia quelen* foram adquiridos da Epagri piscicultura em Santa Catarina e transportados para o Laboratório de Toxicologia Ambiental do Departamento de Farmacologia da UFPR. Os exemplares foram acondicionados em aquários contendo água filtrada e desclorada mantida a aeração e temperatura constante de 27 °C. Um sistema de timer manteve um fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro.

Após um período de 30 dias de aclimação, os peixes foram distribuídos em grupos controle e teste, sendo expostos às concentrações de 2 µg/L (concentração referência do CONAMA), 10 µg/L e 20 µg/L. O bioensaio foi estático com duração de 96 horas.

Após o período de exposição os peixes foram anestesiados com benzocaína diluída em água a 2% e eutanaziados por secção medular. O fígado foi retirado para histopatologia e análise bioquímica dos biomarcadores GST, CAT, SOD, GR e LPO e o músculo e o cérebro para análise da AChE. As amostras para análises bioquímicas foram acondicionadas em gelo durante a coleta e posteriormente, armazenadas em freezer -80 °C. Para histopatologia, um fragmento de fígado de cada exemplar foi coletado e fixado em Alfac, solução de ácido acético glacial, formaldeído 40% e etanol 80%, por 16 horas.

#### 3.2 Biomarcadores bioquímicos

Uma amostra de cérebro e músculo axial de cada peixe foi obtida, pesada e homogeneizada em tampão fosfato 0,1M, pH 7,5 na proporção de 1:10, utilizando um microhomogeneizador. Os homogeneizados foram centrifugados por 20 min a 4°C a 10000 x g. Alíquotas dos sobrenadantes (fração S9) foram armazenadas a -20° C para posterior análise da atividade de AChE e concentração protéica.

As amostras de fígado (*pools* de dois fígados) foram descongeladas em gelo moído e pesadas. Uma parte homogeneizada na proporção 1:10 em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2 com auxílio de microhomogeneizador. O homogeneizado foi centrifugado por 30 minutos a 12.000 x g a 4°C, obtendo-se assim o sobrenadante,

do qual foram retiradas duas alíquotas para medir a atividade da GST, CAT, SOD, GR e LPO. A outra parte foi homogeneizada na proporção 1:10 em metanol 30% e centrifugada por 30 minutos a 12.000 x g a 4°C obtendo-se o sobrenadante para medir a lipoperoxidação.

### 3.2.1 Atividade da GST

A análise da atividade da GST foi baseada no método de Keen et al. (1976). As GSTs catalisam a reação de conjugação do substrato CDNB (1-cloro- 2,4-dinitrobenzeno) com a glutatona reduzida (GSH), formando um tioéter que pode ser medido pelo aumento de absorbância através da leitura em microplacas.

As amostras foram diluídas (1:10 v/v) em tampão fosfato 0,1M, pH 6,5 e pipetadas em quatro réplicas de 20 µl na microplaca de leitura em espectrofotômetro, seguido de 180 µl de solução reação. A solução reação foi composta por CDNB a 3mM e GSH 3mM, em solução tampão fosfato 0,1M, pH 6,5. A leitura foi realizada em espectrofotômetro TECAN SUNSHINE com comprimento de onda de 340nm, durante 3 min e a atividade enzimática foi expressa em µmol de CDNB conjugado/min/mg proteína.

### 3.2.2 Atividade da CAT

A análise da atividade da catalase foi baseada no método descrito por Aebi (1984) que consiste em mensurar a atividade da catalase através do consumo de peróxido de hidrogênio exógeno, gerando oxigênio e água, através de espectrofotometria.

As amostras foram diluídas (1:5 v/v) em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 e pipetadas em 3 réplicas de 10 µl em cubetas de quartzo seguido de 990 µl de solução reação. A solução reação foi composta por peróxido de hidrogênio 20 mM, em solução tampão (TRIS-HCl 1M, EDTA 5mM, pH 8). A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 240nm, por 1 min e 30 seg e a atividade enzimática foi expressa em µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumido/min/mg proteína.

### 3.2.3 Atividade de SOD

A análise da atividade da SOD foi realizada pelo método proposto por CROUCH et al. (1981), que se baseia na capacidade da SOD em inibir a redução do NBT para azul pelo  $O_2^-$  gerado pela hidroxilamina em solução alcalina, sendo que a redução do NBT é medida espectrofotometricamente a 560 nm.

Às amostras foi adicionado etanol de modo que ficassem com 25% desse, foram centrifugadas durante vinte minutos a 12 000 x g. Na microplaca foi pipetado o “branco” com 20 µl de etanol e 20 µl das amostras do sobrenadante centrifugado. Após foi pipetado 70 µl da mistura de NBT A 285 mM e EDTA 0,05 mM, por último adicionou-se 110 µl de tampão carbonato de sódio (182 mM, pH 10,2) e hidroxilamina 67 mM para iniciar a reação. A leitura foi feita a 560 nm em espectrofotômetro TECAN SUNSHINE durante uma hora em intervalos de cinco minutos. A atividade enzimática foi expressa em µml/min/mg proteína.

### 3.2.4 Atividade da GR

A análise da atividade da GR foi realizada pelo método de Sies et al. (1979), em que a enzima GR catalisa a redução da glutathiona oxidada (GSSG) através da oxidação do NADPH, cujo decréscimo de absorbância à 340 nm é medido espectrofotometricamente.

Em microplaca foi pipetada 50 µl da amostra e em seguida 100 µl do meio de reação que consiste em tampão fosfato de potássio 0,1 M, EDTA 5,0 mM, pH 7,6 adicionado a GSSH a 5,0 mM e NADPH a 0,5 mM. A leitura foi feita a cada vinte segundos por dois minutos a 340 nm em espectrofotômetro TECAN SUNSHINE. A atividade enzimática foi expressa em nmol/min/mg proteína.

### 3.2.5 LPO

A produção de hidroperóxidos lipídicos foi verificada pelo método de FOX (*Ferrous Oxidation / Xylenol Orange Method*). Esse método tem por princípio a rápida oxidação do  $Fe^{+2}$  mediada por peróxidos sob condições ácidas e posterior formação do complexo  $Fe^{+3}$  – laranja de xilenol (fonte de absorção de luz) na presença do estabilizador hidroxitolueno butilado (JIANG et al., 1992).

O sobrenadante foi diluído na proporção 1:5 em metanol 30%, centrifugado por 10 minutos a 10.000 x g a 4°C obtendo-se a amostra.

As amostras foram pipetadas (30 µl), em microplaca e em seguida foi adicionado 270 µl de solução reação [(laranja de xilenol a 100 µM, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 25 mM, BHT (hidroxitolueno butilado) a 4 mM, FeSO<sub>4</sub>.NH<sub>4</sub> (sulfato ferroso amoniacal) a 250 µM (acrescentados na sequência descrita a metanol 90%)], e incubadas por 30 min antes da leitura. Foram feitas três réplicas. A leitura foi feita em espectrofotômetro de microplaca TECAN SUNSHINE ( $\lambda$  = 570 nm). Os resultados foram expressos em concentração de hidroperóxidos (nmol.min<sup>-1</sup>.mgproteína<sup>-1</sup>).

### 3.2.6 Atividade da AChE

As amostras de cérebro e músculo, foram descongeladas em gelo e diluídas na proporção 1:10 (ou 10% V/V) em tampão fosfato 0,1M, pH 7,5. Após a diluição cada amostra foi pipetada (50 µl) na microplaca em quatro réplicas, seguido de 200 µl de 5,5-Ditio-bis-2nitro-benzoato (DTNB) preparado a 0,75 mM e 50µl de iodeto de acetilticolina (ATC) 12mM em água destilada.

O princípio é o desenvolvimento da reação colorida que ocorre entre a colina formada pela quebra da acetilcolina e o DTNB. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplaca TECAN SUNSHINE com comprimento de onda de 405 nm, seguindo método de Ellman et al.(1961) modificado para microplaca por Silva de Assis (1998). A atividade enzimática foi expressa em nmol/min/mg proteína.

### 3.2.7 Análise da concentração de proteína

Para análise da concentração de proteína dos tecidos (cérebro, músculo e fígado) foi utilizado o método de Bradford (1976) utilizando soro albumina bovina como padrão. As amostras foram diluídas na proporção 1:20 em tampão fosfato de potássio 0,1M e a leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 620 nm.

### 3.3 Biomarcador Histopatológico

#### 3.3.1 Microscopia de luz - Análise histopatológica de fígado

Após a remoção do fígado, ele foi imerso em fixador Alfac durante um período de 16 horas. Após esta fase, as peças passaram pelo processo da desidratação em série alcoólica crescente, diafanização em xilol, impregnação e inclusão em Paraplast Plus® (Sigma) (56°C). Os blocos obtidos foram trimados para a obtenção dos cortes histológicos com espessura de cinco micrômetros, que foram distendidos sobre lâmina histológica e corados com Hematoxilina e Eosina (H.E.) segundo protocolo anexo. As mesmas foram analisadas e fotografadas digitalmente no fotomicroscópio Leica DME.

#### 3.3.2 Avaliação histopatológica

As alterações histopatológicas observadas no fígado de todos os exemplares utilizados neste trabalho foram avaliadas de acordo com o método descrito por BERNET et al. (1999). Estas foram consideradas de acordo com os seus respectivos fatores de importância (Tabela 1), onde: (1) importância patológica mínima, a lesão é facilmente reversível; (2) importância moderada, reversível em muitos casos e (3) importância marcante, geralmente irreversível, levando a diminuição das funções do órgão. De acordo com o grau de ocorrência, foram atribuídos valores para as alterações observadas em cada tratamento, sendo: (0) Inalterado, (2) Ocorrência Ocasional, (4) Ocorrência Moderada e (6) Ocorrência severa (lesão difusa). O Índice de lesão (IL) foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$IL = \sum pr \sum alt (a \times w)$$

Onde: pr = padrão de reação, alt = alteração, a = valor atribuído à alteração e w = fator de importância.

Unidade Funcional	Alteração	Fator de importância
Fígado	Necrose	3
	Infiltração leucocitária	2
	Vacuolização dos hepatócitos	1

Tabela 1: Alterações histopatológicas analisadas em fígado de *Rhamdia quelen* com seus respectivos fatores de importância (modificado a partir de Bernet et al., 1999).

### 3.3.3 Análise quantitativa dos centros de melanomacrófagos e melanomacrófagos livres em fígado

A ocorrência de melanomacrófagos foi avaliada de acordo com Rabitto et al. (2005), de acordo com esta metodologia centros de melanomacrófagos e melanomacrófagos livres são contados em 15 campos de cada lâmina. Os centros de melanomacrófagos e melanomacrófagos livres foram contados através de um sistema-teste quadriculado acoplado a uma das oculares do microscópio, cuja área era de  $1\text{mm}^2$  onde cada quadrado media  $0,01\text{mm}^2$ . Foram analisados 15 campos escolhidos aleatoriamente em lâminas de fígado de todos os indivíduos utilizados no estudo, coradas em H.E. através de microscopia de luz. O número de melanomacrófagos livres foi considerado como sendo aqueles que continham de 1 a 4 células pigmentadas e os centros de melanomacrófagos os que continham um número igual ou superior a 5 células pigmentadas. Os resultados da contagem dos melanomacrófagos foram apresentados por  $\text{mm}^2$ .

### 3.4 Análises estatísticas

Para os biomarcadores bioquímicos os dados obtidos foram analisados estatisticamente através do Programa *GraphPad Prism 3* através de ANOVA de uma via seguida de Prova de Bonferroni com limite de significância em 0,05. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.

Para histopatologia utilizou-se o programa estatístico *GraphPad InStat V.3.0*. A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, foi aplicado o teste não paramétrico de Mann Whitney para fígado. O número de melanomacrófagos foi analisado estatisticamente pelo teste *t* de Student no Programa *GraphPad InStat*. A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

## 4. RESULTADOS

Não houve mortalidade de jundiás durante o bioensaio de exposição, e os indivíduos testados permaneceram aparentemente saudáveis até o final do experimento.

### 4.1 Biomarcadores bioquímicos

#### 4.1.1 Atividade da Glutathione S-transferase

A atividade da GST (Figura 5) do grupo exposto à concentração de 10  $\mu\text{g/L}$  de cloreto de cobre mostrou-se significativamente induzida em comparação ao grupo controle.

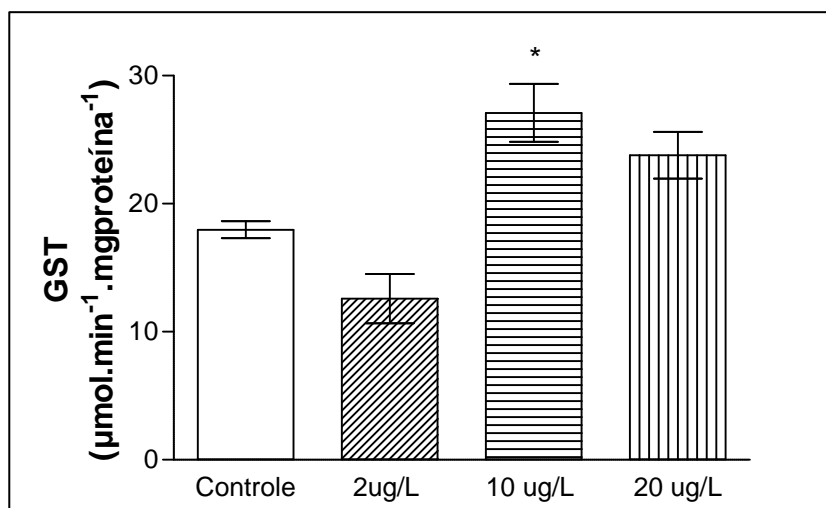


Figura 5: Atividade da GST de *Rhamdia quelen* expostos ao cloreto de cobre por 96 horas. As barras expressam a média da atividade da GST  $\pm$  erro padrão. \* = difere significativamente do controle ( $p < 0,05$ ) quando testados por ANOVA de uma via seguida de Teste de Bonferroni

#### 4.1.2 Atividade das enzimas antioxidantes e lipoperoxidação

A atividade da SOD dos grupos expostos às concentrações de 10  $\mu\text{g/L}$  e 20  $\mu\text{g/L}$  de cloreto de cobre mostrou-se aumentada em comparação ao grupo controle (Figura 6). Não foi observada diferença entre os grupos para a atividade da catalase (Figura 7). A enzima glutathione redutase (GR) (Figura 8) mostrou-se significativamente inibida na maior concentração em relação ao controle. Finalmente, a lipoperoxidação (Figura 9) analisada mostrou-se maior na concentração de 10  $\mu\text{g/L}$  de cloreto de cobre em comparação ao controle.

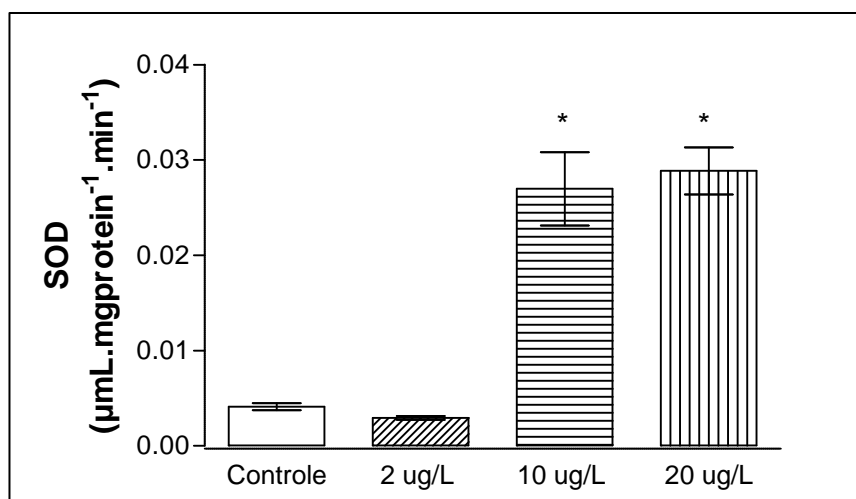


Figura 6: Atividade da SOD de *Rhamdia quelen* expostos ao cloreto de cobre por 96 horas. As barras expressam a média da atividade da SOD  $\pm$  erro padrão. \* = difere significativamente do controle ( $p < 0,05$ ) quando testados por ANOVA de uma via seguida de Teste de Bonferroni

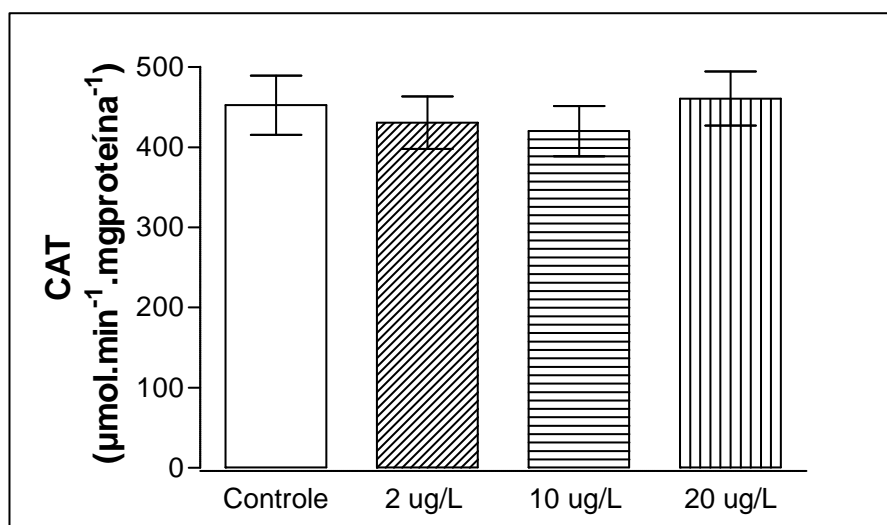


Figura 7: Atividade da CAT de *Rhamdia quelen* expostos ao cloreto de cobre por 96 horas. As barras expressam a média da atividade da CAT  $\pm$  erro padrão.



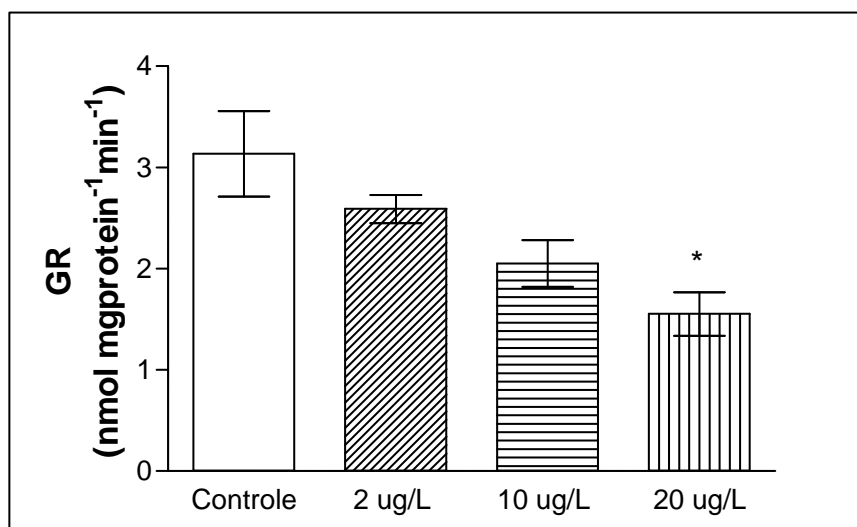


Figura 8: Atividade da Glutathione Redutase de *Rhamdia quelen* expostos ao cloreto de cobre por 96 horas. As barras expressam a média da atividade da GR  $\pm$  erro padrão. \* = difere significativamente do controle ( $p < 0,05$ ) quando testados por ANOVA de uma via seguida de Teste de Bonferroni

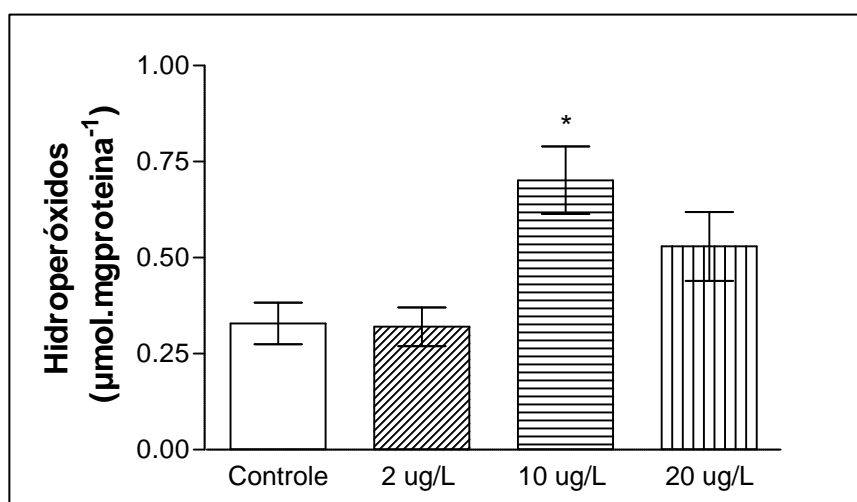


Figura 9: Lipoperoxidação expressa por concentração de hidroperóxidos em *Rhamdia quelen* expostos ao cloreto de cobre por 96 horas. As barras expressam a média da concentração de hidroperóxidos  $\pm$  erro padrão. \* = difere significativamente do controle ( $p < 0,05$ ) quando testados por ANOVA de uma via seguida de Teste de Bonferroni

#### 4.1.3 Atividade da AChE

A atividade enzimática da acetilcolinesterase muscular (Figura 10) apresentou diferença significativa apenas na dose de 20  $\mu\text{g/L}$ , na qual a atividade se mostrou um pouco maior em relação ao controle. Entretanto, na atividade de acetilcolinesterase cerebral (Figura 11) não foi observada diferença significativa entre os grupos-teste e controle.

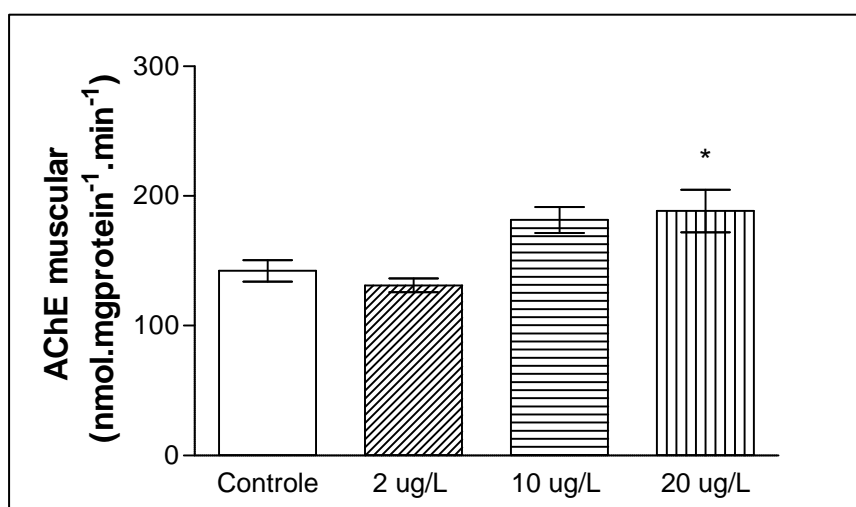


Figura 10: Atividade da acetilcolinesterase muscular de *Rhamdia quelen* expostos ao cloreto de cobre por 96 horas. As barras expressam a média da atividade da acetilcolinesterase muscular  $\pm$  erro padrão. \* = difere significativamente do controle ( $p < 0,05$ ) quando testados por ANOVA de uma via seguida de Teste de Bonferroni

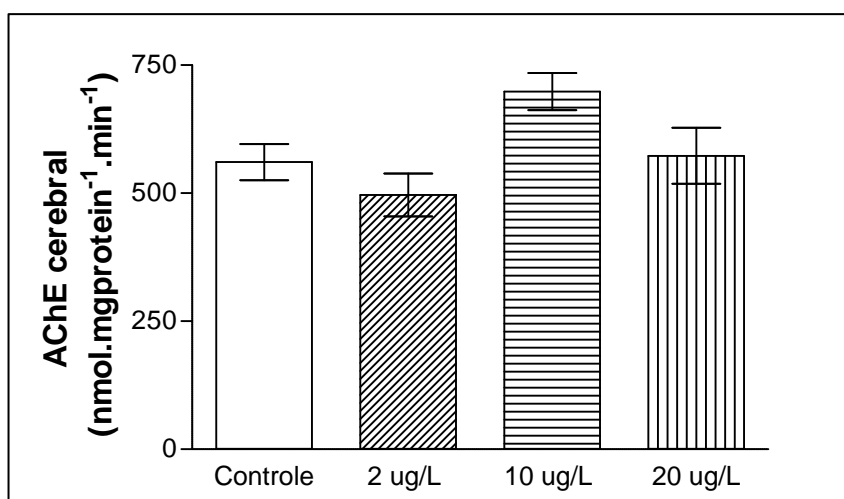


Figura 11: Atividade da acetilcolinesterase cerebral de *Rhamdia quelen* expostos ao cloreto de cobre por 96 horas. As barras expressam a média da atividade da acetilcolinesterase muscular  $\pm$  erro padrão.

## 4.2 Análise histopatológica

De acordo com as observações feitas na análise histopatológica as alterações mais comumente observadas foram infiltrações leucocitárias, vacuolização dos hepatócitos e necroses além de aumento da incidência de centros de melanomacrófagos nas doses mais altas. Todos esses fatores contribuíram para um notável índice de lesão histopatológica nos grupos expostos as concentrações de 10  $\mu\text{g/L}$  e 20  $\mu\text{g/L}$  (Figura 12).

A análise também evidenciou que tanto os indivíduos do grupo controle (Figura 14) quanto os expostos às três concentrações do contaminante mantiveram a estrutura padrão dos hepatócitos e morfologia estrutural normal à espécie analisada.

O grupo exposto à menor concentração de cloreto de cobre (Figura 15) apresentou pequena incidência de infiltrações leucocitárias e formação tanto de centros de melanomacrófagos, como presença de melanos livres, além de certa vacuolização em áreas do tecido e pequenas necroses.

Já os indivíduos expostos às concentrações de 10 µg/L (Figura 16) e 20 µg/L (Figura 17) apresentaram além de maior incidência de infiltrações leucocitárias e formação de centros de melanomacrófagos em relação ao grupo controle, necroses que variavam de pequenas a grandes em tamanho e localizavam-se pontualmente ou em mais de um lugar no tecido observado. A presença de melanos livres nos tecidos de todos os grupos expostos ao cloreto de cobre e o controle não foi significativa (Figura 14).

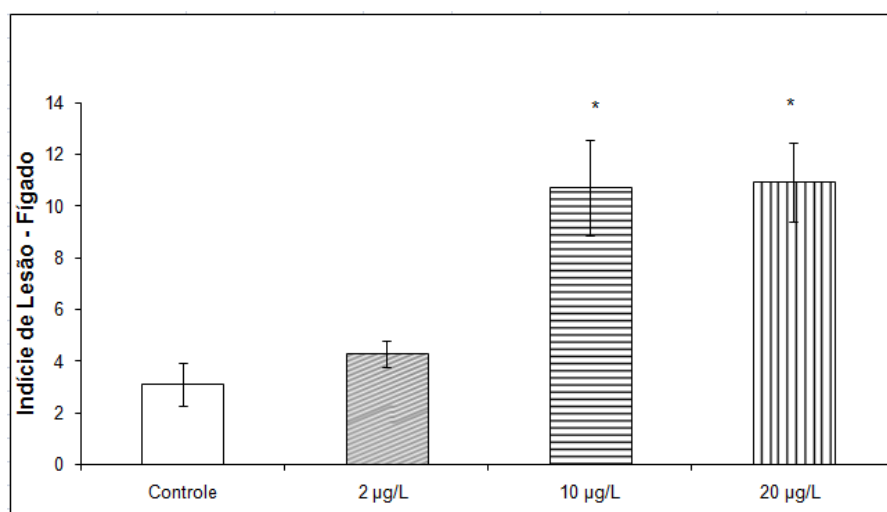


Figura 12: Índice de lesão de acordo com o método de avaliação de BERNET et al. (1999) em fígado de *Rhamdia quelen*. As barras expressam a média de lesões  $\pm$  erro padrão da média. \* = difere significativamente do controle ( $p < 0,05$ ).

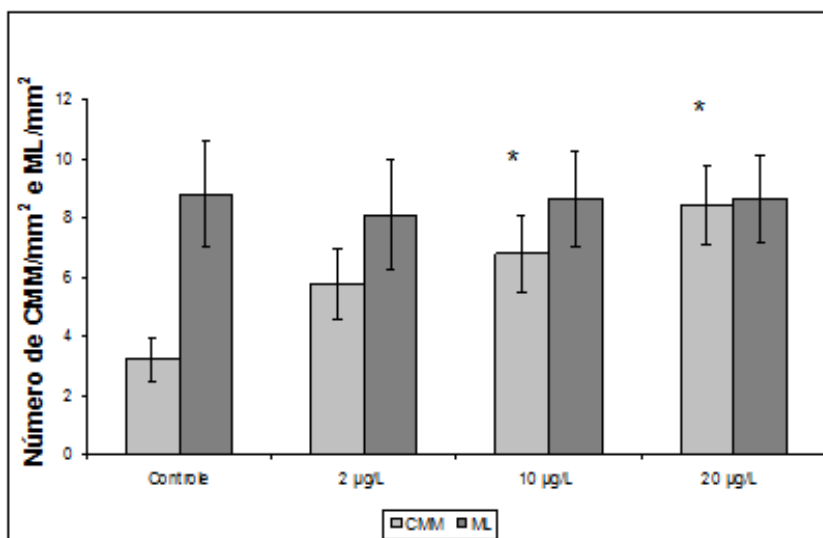


Figura 13: Análise quantitativa dos centros de melanomacrófagos (CMM/mm<sup>2</sup>) e melanomacrófagos livres (ML/mm<sup>2</sup>) em fígado de *Rhamdia quelen*. As barras expressam a média de lesões  $\pm$  erro padrão da média. \* = difere significativamente do controle ( $p < 0,05$ ).

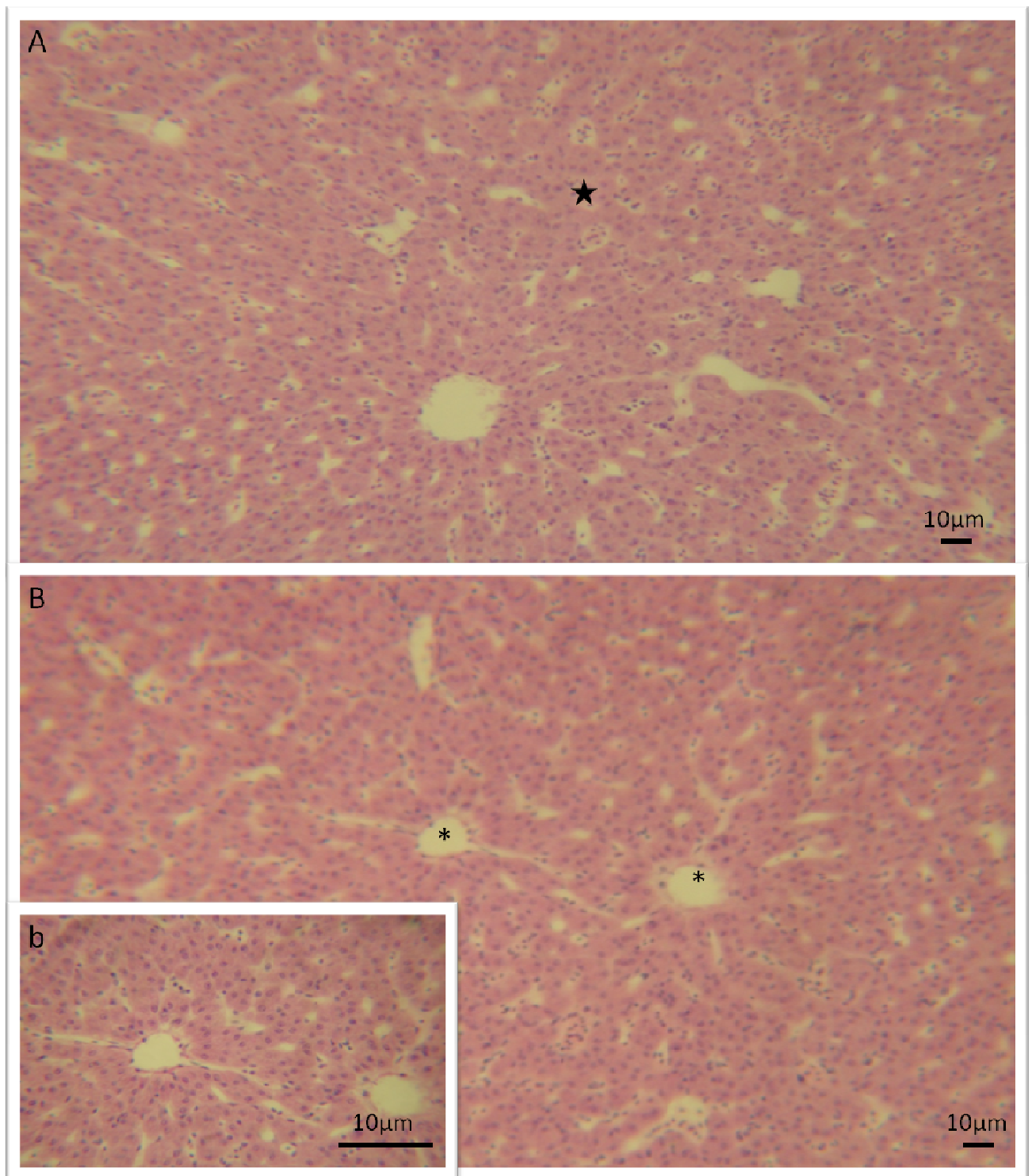


Figura 14: Cortes histológicos de fígado de *Rhamdia quelen*, grupo controle. Coloração hematoxilina-eosina. A) Visão panorâmica do tecido. Na imagem está indicado o parênquima hepático ( ★ B) veias centrolobulares indicadas (\*). b) detalhes das veias centrolobulares.

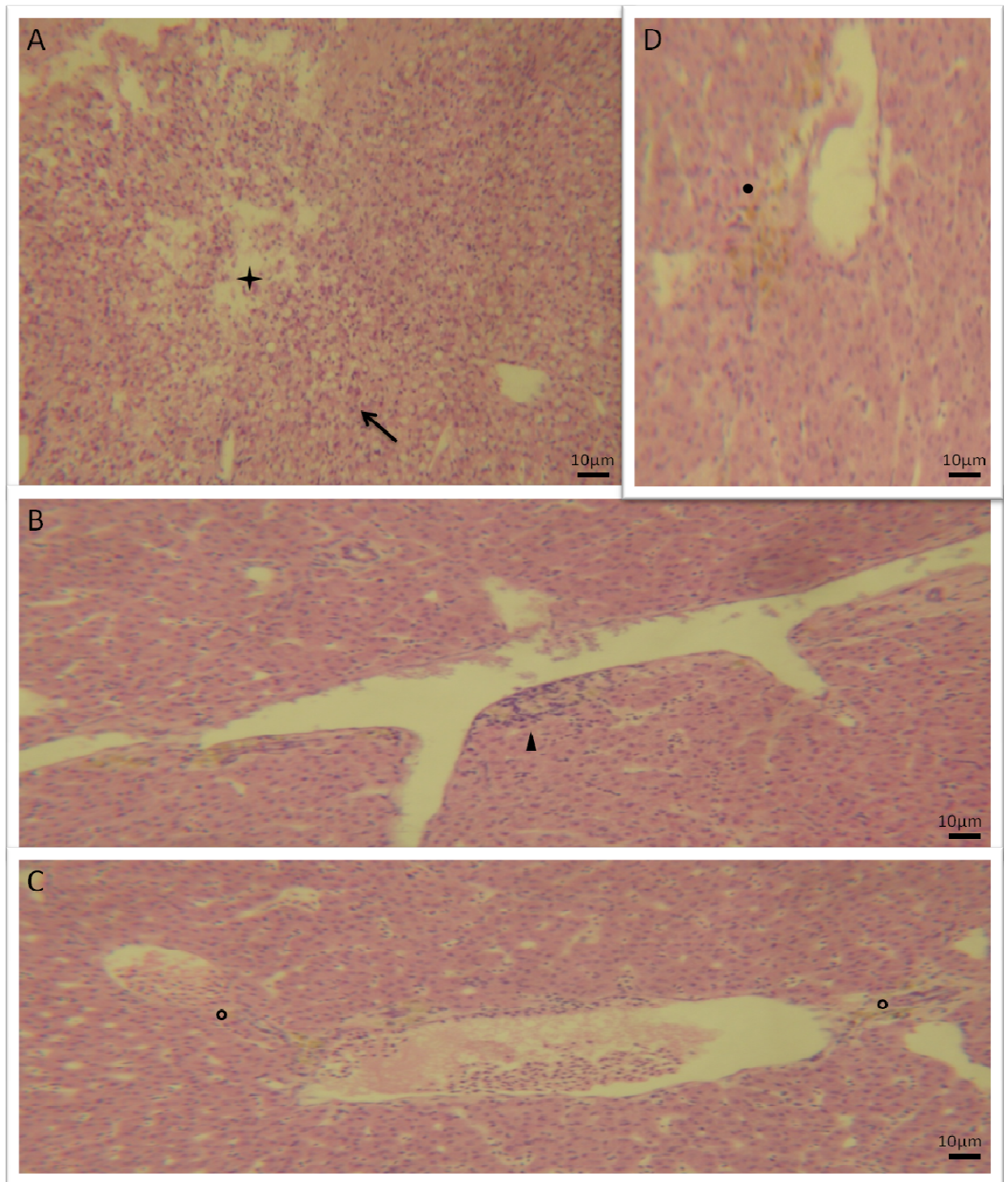


Figura 15: Cortes histológicos de fígado de *Rhamdia quelen*, grupo 2µg/L. Coloração hematoxilina-eosina. A) Vacuolização dos hepatócitos ( → ) e necrose ( ★ ). B) Infiltração leucocitária ( ▲ ) C) Melanos livres ( ● )



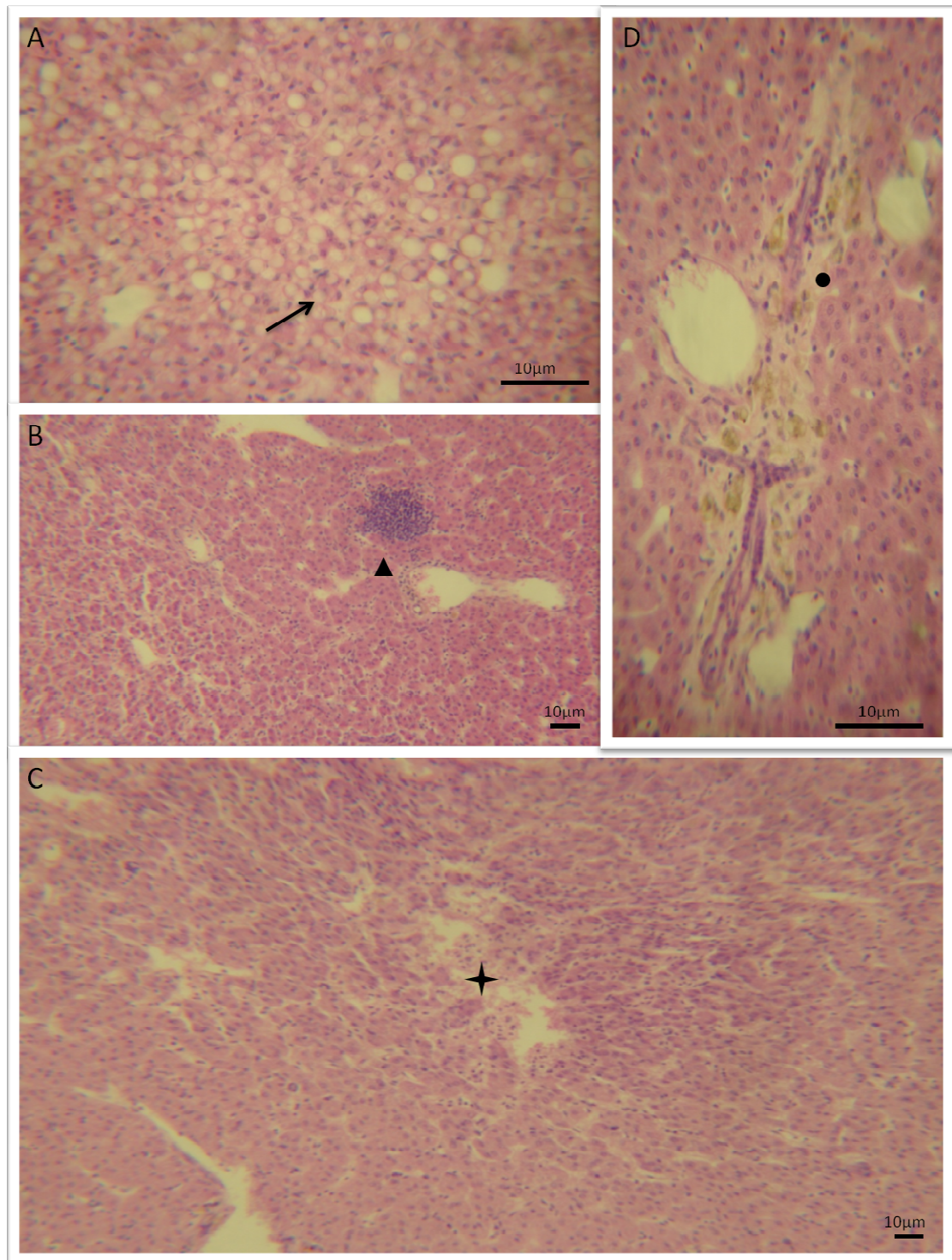


Figura 16: Cortes histológicos de fígado de *Rhamdia quelen*, grupo 10µg/L. Coloração hematoxilina-eosina. A) Vacuolização dos hepatócitos (→). B) Infiltração leucocitária (▲), C) Necrose (✦). D) Centros de melanomacrófagos (●)

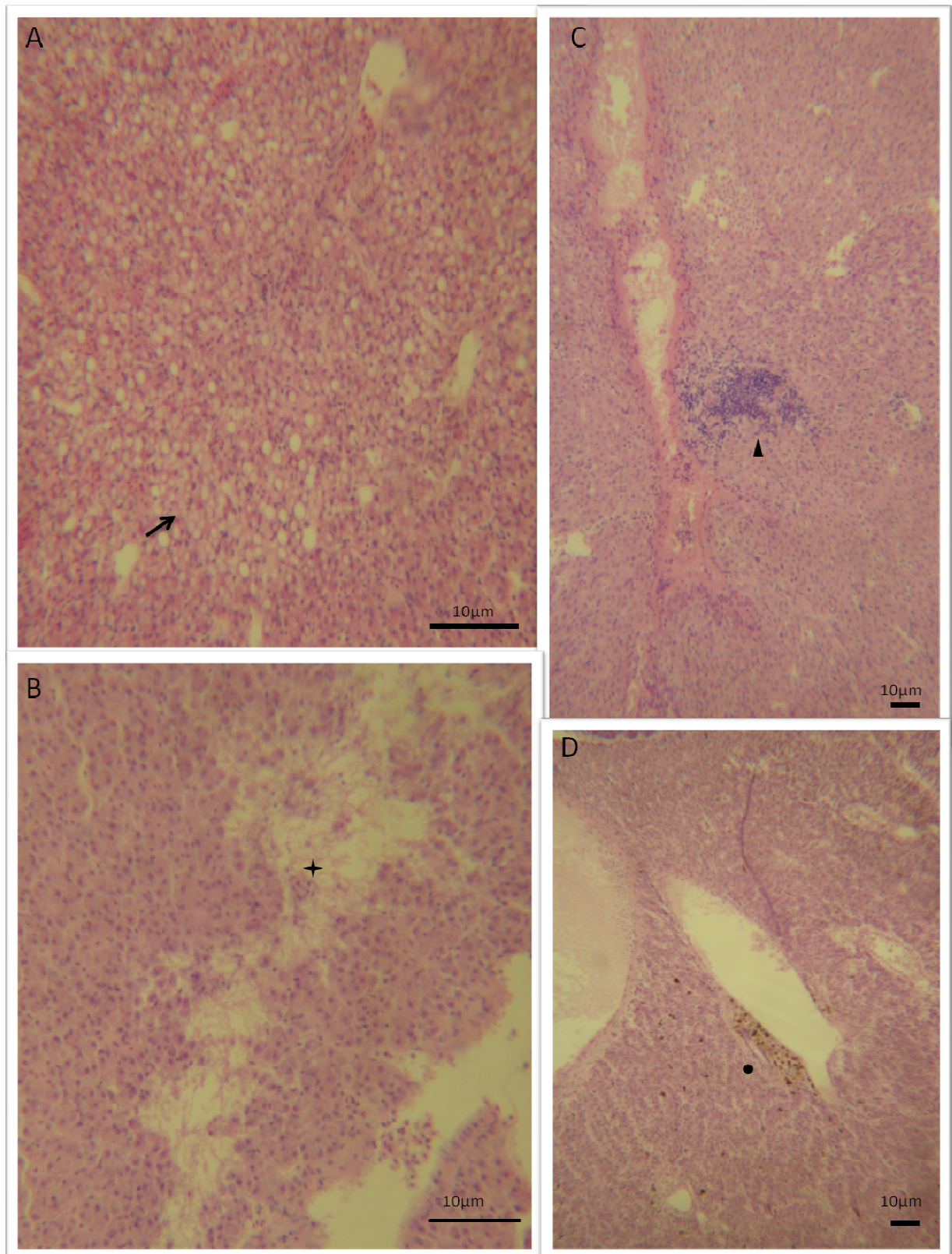


Figura 17: Cortes histológicos de fígado de *Rhamdia quelen*, grupo 20µg/L. Coloração hematoxilina-eosina. A) Vacuolização dos hepatócitos (→). B) Necrose (+). C) Infiltração leucocitária (▲). D) Centros de melanomacrófagos (●).



## 5. DISCUSSÃO

A glutathiona-S-transferase enzima pertencente à fase II de biotransformação é de grande importância no processo de detoxificação celular e também está envolvida com o processo de estresse oxidativo. No experimento em questão a atividade da GST do grupo contaminado com a concentração intermediária de cloreto de cobre (10 µg/L) foi a única que se mostrou significativamente maior em relação ao controle.

Usualmente, aumentos na atividade da GST são relatados em diversos estudos quando da exposição a diversos poluentes ambientais como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, polifenilas bicloradas e produtos derivados da atividade petroquímica. Porém, sobre o efeito de metais os registros são confusos e diferentes mecanismos de ação e efeitos tem sido descritos (CUNHA et al., 2007). Já foram encontradas desde repostas inibitórias da GST quando peixes são expostos a compostos de cobre (DAUTREMEPUTIS et al., 2002) até a não alteração da atividade desta enzima (SANCHEZ et al., 2005).

No entanto, a maioria dos trabalhos relata aumento na atividade enzimática da GST quando exposta ao cobre. Em LOPES et al. (2001) peixes coletados de áreas de mineração de cobre apresentaram aumento na atividade da enzima. GSTs de brânquias de *Pomatoschistus microps* também expostos ao cobre apresentaram igualmente indução de atividade (VIEIRA et al., 2009).

Respostas de aumento da atividade de GSTs em diferentes tecidos não são novidade, haja vista que o cobre é um conhecido promotor de estresse oxidativo. A toxicidade hepática resultante da exposição ao cobre é hipotetizada pela reação na qual íons de cobre reagiriam com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formando ainda mais reativas espécies de oxigênio (AWASTHI et al., 1996; POURAHMAD & O'BRIEN, 2000; DROGE, 2002). A ligação da GST ao cobre seria uma barreira à ligação desse metal a compostos celulares, evitando assim o prejuízo às funções celulares normais (VIEIRA et al., 2009).

Peixes da espécie *Carassius auratus* expostos ao sulfato de cobre apresentaram resultados de aumento da atividade da GST do tecido hepático nas concentrações de 2,50 µg/L e 5 µg/L e nas concentrações maiores de 50 µg/L e 250 µg/L a atividade enzimática da GST não foi alterada em relação ao grupo controle

(LIU et al., 2006). *Danio rerio* expostos a concentrações de 40 µg/L e 140 µg/L de cobre apresentaram em ambas as concentrações aumento da atividade de GST (PARIS-PALACIOS et al., 2000). Considerando esses dados é possível a inferência de uma não responsividade das GSTs frente a uma exposição a concentrações muito elevadas de cobre, sendo os mecanismos desse bloqueio enzimático ainda não bem elucidados. Porém uma explicação satisfatória para o aumento da atividade da GST na concentração de 10 µg/L e a não responsividade na concentração mais alta de 20 µg/L é difícil e provavelmente esse resultado seja consequência de problemas amostrais e/ou metodológicos ou diferenças de respostas ao contaminante que variam de espécie a espécie.

A SOD respondeu ao cobre com indução de atividade nas concentrações de 10 µg/L e 20 µg/L, resultado esperado quando do aumento do estresse oxidativo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007), a formação de radicais superóxidos induzem o aumento atividade da enzima. Além de que, sendo o  $\text{Cu}^{+2}$  um cofator necessário para a estrutura e função catalítica da isoforma Cu-Zn SOD, que é a mais representativa no citosol, peroxissomos e núcleo, concentrações subletais de cobre podem induzir a geração e aumento catalítico da SOD (PEDRAJAS et al., 1995; LIU et al., 2005). PEDRAJAS et al. (2005) também observou a formação de novas isoformas da Cu-Zn SOD como consequência do estresse oxidativo. Mudanças na estrutura da enzima envolvem a oxidação da histidina-118, um dos ligantes do cobre (USHIDA & KAWAKISHI, 1994).

Observações onde também foi constatado aumento da atividade da SOD são bem descritas na literatura. Como exemplo pode-se citar PEDRAJAS et al. (1995) que injetou intraperitonealmente  $\text{Cu}^{+2}$  em *Sparus auratus*, VIEIRA et al. (2009) observou os efeitos do cobre e mercúrio em peixes de estuário *Pomatoschistus microps* e FAROMBI et al. (2007) analisou bagres da espécie *Iarias Gariepinus* provenientes do Rio Ogun na Nigéria, o qual está localizado perto das seis maiores indústrias do país e apresenta altos níveis de metais pesados como Cu, Zn, Cd nas águas. Já VARANKA et al. (2001), diferentemente de alguns estudos, constataram aumento da SOD em exposições ao sulfato de cobre na espécie *Cyprinus carpio* em vinte e quatro horas, porém após quarenta e oito horas ocorreu decréscimo da atividade. SANCHEZ et al. (2005) também em exposição ao sulfato de cobre da espécie *Gasterosteus aculeatus* percebeu que depois de quatro dias de experimento após uma súbita alta na atividade da SOD, ela começava a diminuir sua ação. LIU et

al. (2005) observaram que a SOD se mantinha em alta atividade apenas em baixas concentrações de cobre. Esses resultados mostram alguma diferença na resposta enzimática da SOD em relação ao tempo de duração das observações, sendo bastante específico dependendo da espécie em estudo.

Porém, a catalase, outra enzima importante na neutralização de espécies reativas de oxigênio e próxima atuante na cadeia de enzimas antioxidantes depois da SOD, pela razão que ela age na quebra da molécula de  $H_2O_2$  transformando-a em água e oxigênio, não apresentou diferenças significativas em nenhum grupo exposto em relação ao controle.

Aumentos de atividade do sistema SOD-CAT são usualmente observados frente a exposições a inúmeros poluentes e entre esses também os metais (LIVINGSTONE et al., 1993; BURGEOT et al., 1996; STEPHENSEN et al., 2000; DAUTERMEPUITS et al., 2004; VENTURA, 2004; TREVISAN, 2008; VIEIRA et al., 2009). Mais especificamente sobre exposições feitas com cobre PARIS-PALACIOS et al. (2000) observaram aumento de CAT nas concentrações de 40  $\mu g/L$  e 140  $\mu g/L$  de sulfato de cobre, em SANCHEZ et al. (2005) a espécie *Gasterosteus aculeatus* depois da exposição durante vinte e um dias a uma concentração de 200  $\mu g/L$  de Cu continuava a responder com induções da atividade enzimática, ATLI et al. (2006) analisaram a atividade de CAT em *Oreochromis niloticus* usando cloreto de cobre dihidratado em concentrações de 100  $\mu g/L$ , 500  $\mu g/L$ , 1000  $\mu g/L$  e 1500  $\mu g/L$  durante 96 horas e houve aumento da atividade no tecido hepático. FIRAT & KARGIN (2010) concluíram o mesmo em *Cyprinus carpio* expostos a 100  $\mu g/L$  e 1000  $\mu g/L$  de  $Cu^{+2}$  durante dez e vinte dias. O aumento da atividade da CAT em peixes pode estar relacionado ainda à proliferação peroxissomal como um mecanismo de defesa contra a produção de oxirradicais gerados pela biotransformação destes compostos (MATHER-MIHAICH & DIGIULIO, 1991).

Porém, vários estudos da literatura afirmam um decréscimo na atividade de CAT quando há presença de cobre (VARANKA et al., 2001; VUTUKURU et al., 2005; FAROMBI et al., 2007; LIU et al., 2005). Isso é atribuído a uma ligação direta de íons metálicos a grupos SH- na enzima (ATLI et al., 2006), inativação causada pelo excesso na produção de radicais superóxido e diminuição da taxa de reação como resultado de um excesso de produção de  $H_2O_2$  (FAROMBI et al., 2007; VUTUKURU et al., 2005; ATLI et al., 2006). Foi indicado que a rápida inativação da CAT em altas concentrações de peróxido de hidrogênio foi devido a conversão do

composto ativo da enzima em inativo (WONG & WHITAKER, 2000). Ainda, REGOLI & PRINCIPIATO (1995) propõe que a diminuição da atividade de CAT seja uma resposta transitória frente à poluição aguda.

Nenhuma alteração na resposta dessa enzima foi encontrada em ATLI & CANLI (2007), MENEZES (2005) e no presente trabalho. Como a estimulação da atividade da CAT pode ser associada com a eficácia do sistema de defesa antioxidante e/ou compensação da diminuição na atividade de outras enzimas antioxidantes, tais como SOD e GPx, nenhuma mudança significativa na atividade da CAT pode ser atribuída ao aumento da atividade das outras enzimas antioxidantes, como GPx e falha no sistema antioxidante do organismo (ATLI & CANLI, 2007). Ainda é importante ressaltar que a atividade da catalase, como mostrada anteriormente, pode ser inibida ou aumentada sob estresse químico, e tanto uma resposta como a outra depende de variáveis inúmeras como intensidade e tempo de exposição e suscetibilidade do organismo avaliado (MENEZES, 2005).

Já a glutathione redutase foi inibida em relação ao controle. Ela é uma enzima chave no metabolismo da glutathione por reduzir a glutathione oxidada (GSSH) em glutathione reduzida (GSH), que é um substrato necessário para a GPx. Essa última enzima, juntamente com a catalase, catalisa também a quebra da molécula de peróxido de hidrogênio em água. Ademais, o GSH é considerado como um mecanismo de defesa contra o cobre, já que o grupo tiol da cisteína rapidamente reduz o metal formando complexos estáveis de GS-Cu<sup>+1</sup> (SANCHEZ et al., 2005; GRAVATO et al., 2006).

Normalmente, quando há estresse oxidativo num tecido a GR é induzida como relatam vários estudos (WINSTON & DIGIULIO, 1991; FILHO, 1996; VIEIRA et al., 2009; PEREIRA et al., 2010). O uso excessivo da GSH pelas células na tentativa de conter o dano causado pelas ROS estimularia a GR, e sua atividade manteria o balanço GSSH/GSH dentro dos padrões normais evitando a depleção da GSH.

Porém respostas inibitórias são relatadas na literatura com certa frequência. Como por exemplo, OZDEMIR & CIFTCI (2008) após caracterizarem a GR de trutas arco-íris e constatarem que os produtos gerados por essa enzima agem como *feedback* negativo sobre sua atividade, pois a inibem competitivamente, também realizaram experimentos para determinar inibição da GR causada por íons metálicos e puderam mostrar que o cobre apresenta o segundo maior poder inibitório da GR depois apenas dos íons de Cd<sup>+2</sup>. GRAVATO et al. (2006) estudou a

exposição de enguias européias *Anguilla anguilla* L. ao cloreto de cobre nas concentrações de 1  $\mu$ M e 2,5  $\mu$ M e atribuiu a redução da atividade da GR a falhas no sistema antioxidativo do animal, pois houve danos as membranas celulares, MORALES et al. (2004) também atribuiu falha do sistema antioxodante, frente a inibição da enzima. Ainda é importante ressaltar que a GR catalisa uma reação dependente de NADPH e esse último composto é gerado por várias reações do metabolismo intermediário que também podem ter sido prejudicadas pelos efeitos do cobre no metabolismo, então a falta de NADPH seria um limitante na atividade enzimática.

A lipoperoxidação foi maior na dose intermediária de 10  $\mu$ g/L de cloreto de cobre em comparação ao controle. Quando as defesas antioxidantes do indivíduo não conseguem deter a produção de ROS, isso acaba sendo um prelúdio para danos ao DNA, oxidação de proteínas e peroxidação lipídica. Assim, a LPO é um biomarcador de efeito muito utilizado, pois o estresse oxidativo pode causar a peroxidação dos ácidos graxos polinsaturados existentes nos fosfolipídios das membranas celulares com formação de novos radicais livres.

Vários trabalhos relatam a falha do sistema antioxidante e consequente lipoperoxidação de membranas lipídicas quando há exposição ao cobre (VARO et al., 2007; BOUSKILL et al., 2006; HOYLE et al., 2007; VIEIRA et al., 2010). No presente estudo o maior nível de LPO na concentração de 10  $\mu$ g/L concorda com a maior atividade de GST nessa mesma concentração, porém a maior atividade dessa enzima não foi o bastante para deter a lipoperoxidação.

Finalizando, a avaliação da atividade da acetilcolinesterase não se mostrou alterada no tecido cerebral e foi pouco aumentada no muscular. Na literatura há uma grande variação da resposta da AChE aos metais. Normalmente, são relatados quadros de inibição da enzima em questão, comparando a capacidade de inibição dos metais pesados, incluindo o cobre, com organofosforados e carbamatos que são compostos conhecidamente inibidores de AChE (SURESH et al., 1992; BOCQUENÉ et al., 1995; GARCIA et al., 2000; FRASCO et al., 2005; ROMÉO et al., 2006; CUNHA et al., 2007). Provavelmente a concentração testada no presente estudo não seja tão alta para provocar alterações consideráveis na atividade catalítica da AChE. Estudos também já relataram que não houve alteração na atividade da enzima quando peixes foram expostos ao cobre ou compostos de cobre (VARO et al., 2007). Ainda, alguns casos de aumento da

atividade da acetilcolinesterase também foram relatados em DETHLOFF et al. (1999) e ROMANI et al. (2003).

ROMANI et al. (2003), constataram a existência de duas isoformas enzimáticas da acetilcolinesterase a globular (G) e a assimétrica (A) que parecem ter importância quando da exposição subletal ao cobre. A forma globular, mais representativa nos tecidos cerebral e muscular, é aparentemente afetada pelo cobre enquanto a isoforma A permanece inalterada em sua atividade. Estudos cinéticos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o cobre melhora a atividade catalítica da enzima em questão nos tecidos cerebrais e musculares de *S. auratus*, e isso acontece aparentemente pelo aumento da afinidade enzima-substrato.

Entretanto, como a maior parte da literatura relata que os íons metálicos de mercúrio, cádmio, cobre e zinco inibem a atividade da acetilcolinesterase, mesmo que ainda não sejam tão clara essas vias (VARO et al., 2007), os resultados encontrados na literatura sobre os efeitos dos metais sobre a AChE podem ser atribuídos a diferenças de resposta entre as espécies, condições de estudo diversas, tempo de duração da exposição e tecido exposto ao xenobiótico e ainda a problemas metodológicos (DETHLOFF et al., 1999; VARO et al., 2007). Essa última variável é relacionada com a interferência de íons metálicos com os grupos tiol da tiocolina, um produto da hidrólise do substrato acetilcolina, e com certas soluções como o tampão fosfato (FRASCO et al., 2005).

Os resultados da histologia mostraram que o cobre causou danos ao tecido hepático, sendo que à medida que as doses aumentavam os danos tornavam-se mais severos. Evidências mostram que o fígado é primeiro tecido a acumular cobre e como consequência desse acúmulo pode apresentar danos histopatológicos causados pelo metal (TÓTH et al., 1996; SANTOS, 2003). Entretanto, não foi observada alteração na estrutura do parênquima hepático depois de 96 horas de exposição em nenhuma das concentrações, isso corrobora os resultados de PARIS-PALACIOS et al. (2000), que após sete dias de exposição à concentração de 40 µg/L também não observaram mudanças na estrutura celular do parênquima não lesado, SANTOS (2003) também observou a organização do parênquima hepático dos grupos expostos por cobre na ração muito parecidos com o controle negativo.

Em relação às patologias observadas, a menor dose apresentou alterações como vacuolização de algumas áreas do tecido hepático, assim, o mesmo foi observado em SANTOS (2003) nos exemplares de tilápia *Oreochromis niloticus*

expostos as concentrações de 4 mg e 40 mg de cobre por via trófica. O aspecto vacuolizado ocorre quando da preparação histológica, pela eliminação das vesículas contendo lipídios, durante a preparação das amostras para a análise. O acúmulo de lipídio hepático pode estar vinculado à característica da espécie, ao período reprodutivo, dietas ricas em gorduras ou intoxicação (WOLF & WOLFE, 2005). Acredita-se que a vacuolização encontrada nos animais deste experimento pode estar relacionada com a presença do cloreto de cobre, pois o acúmulo de lipídios permite a imobilização de certos compostos nocivos.

Necroses também foram detectadas no experimento como mostram as Figuras 15, 16 e 17, evidenciando provavelmente, a alta sensibilidade do organismo teste ao cloreto de cobre. Assim, as necroses que foram encontradas em menor e maior graus em todas as concentrações a que foram expostos os peixes é um dado importante, porque essa alteração tem sido foco de atenção na toxicologia, pois tende representar danos estruturais e funcionais que propiciam a perda da integridade e falência do órgão, interferindo na saúde dos indivíduos e no equilíbrio populacional (RABITTO *et al.*, 2005). Assim, em paralelo ao descrito na literatura que identifica o cobre como um agente causador de alterações histológicas, desde SULTAN & KHAN (1983) que analisaram os efeitos do sulfato de cobre em *Carassius auratus* passando por PARIS-PALACIOS *et al.* (2000), VARANKA *et al.* (2001) e SANTOS (2003) que relataram a incidência de necroses nos fígados de peixes em exposições ao cobre. Essa alteração pode ocorrer por meio de vários mecanismos como ruptura lisossomal, hipóxia tecidual, distúrbio na síntese protéica e metabolismo de carboidratos (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2002; ROSA *et al.*, 2005; HINTON *et al.* 2008). Considerando que o fígado é o principal órgão de desintoxicação nos vertebrados, e como já anteriormente ressaltado que essas alterações comprometem o funcionamento metabólico do órgão e conseqüentemente as enzimas de combate ao estresse oxidativo e desintoxicação também, isso explica em parte os resultados encontrados nesse trabalho que culminaram em estresse oxidativo.

A maior incidência de infiltrações leucocitárias nas concentrações de 10 µg/L e 20 µg/L indicam além de processos inflamatórios no tecido (BERNET *et al.*, 1999) uma possível relação ao elevado nível de necroses encontrados no tecido. Porque sabe-se que a ocorrência de necroses está diretamente ligada ao comprometimento

das membranas celulares,então, a lesão destas estruturas pode implicar no aumento da presença de células de defesa como o recrutamento de leucócitos (SILVA, 2010). Dessa maneira, em casos de lesões celulares, diferentes tipos de leucócitos são atraídos para o local. Porém, de uma forma geral, suas funções são neutralizar e destruir a fonte agressora, retirando o agente agressor e células mortas, além de induzir a recuperação do tecido lesado (BOEGER, 2004).

Diferenças significativas na incidência de centros de melanomacrófagos (CMM) nas concentrações mais altas foram observadas. Esses centros são caracterizados como células pigmentadas encontradas em tecidos de animais heterotérmicos, nos quais melanina, lipofuscina ou hemosiderina são os pigmentos mais comuns. O papel dos CMM no fígado ainda é incerto, porém a literatura afirma que a análise histopatológica de CMM pode ser um indicador sensível quando os organismos estão expostos a condições adversas e sugere que esses centros estejam relacionados à desintoxicação e reciclagem de compostos endógenos e exógenos (AGIUS & ROBERTS, 2003; CAMARGO & MARTINEZ, 2007; LEKNES, 2007; HINTON et al., 2008). Uma das hipóteses é que a melanina dos macrófagos neutraliza os radicais livres liberados como resultado do catabolismo de ácidos graxos derivados da fagocitose de membranas celulares a baixas temperaturas (CLEMENTE, 2009). Então a resposta positiva no aumento dos CMM, pode ser traduzida como um provável sinal da toxicidade do cloreto de cobre ao *Rhamdia quelen*.



## 6.CONCLUSÃO

O presente trabalho pode concluir que a exposição ao cloreto de cobre em concentrações subletais no organismo teste, o *Rhamdia quelen*, causa efeitos deletérios ao peixe.

O desenho experimental se mostrou satisfatório para os objetivos propostos e a espécie *Rhamdia quelen* pode ser considerada um bom modelo biológico, pois adapta-se as condições laboratoriais e a manipulação durante o experimento.

Os biomarcadores que se mostraram efetivos na avaliação da toxicidade do cobre foram nas análises bioquímicas, a atividade da enzima SOD. A histopatologia e a contagem de centros de melanomacrófagos nas análises histológicas.

A menor concentração avaliada que é permitida por lei nos corpos d'água brasileiros não mostrou significativas diferenças em relação ao controle na avaliação dos biomarcadores bioquímicos, porém algumas alterações histológicas foram encontradas nessa concentração.

## 7. RERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AASETH, J.; NORSETH, T. Copper. In FRIBERG, L.; NORDBERG, G. F.; VOUK, V. B. editors. Handbook on the toxicology of metals. Second edition. Volume II: specific metals. Elsevier, New York. 233-254, 1986.

AEBI, H. Catalase in vitro. Academic Press. 105:121-126, 1984.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for copper, 2004. <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp132.pdf>> acesso em 15 de Maio de 2010.

ANKLEY, G. T.; et al. Predicting the acute toxicity of copper in freshwater sediments: evaluation of the role of acid-volatile sulfide. Environ. Toxicol. Chem. 12:315-320, 1993.

ANTHONY, J. W.; et al. Handbook of Mineralogy: Halides, hydroxides, oxides- Mineral Datapublishing<<http://www.handbookofmineralogy.org/pdfs/eriochalcite.pdf>> acesso em 04 de Maio de 2010.

APGAR, G.A.; et al. Evaluation of copper Sulfate and copper lysine complex as growth promoters for weanling swine. J. Anim. Sci.,73 :2640-2646, 1995.

AL- YOUSUF, M. H.; et al. Trace metals in liver, skin and muscle of *Lethrinus lentjan* fish species in relation to body length and sex. Sci. Total Environ. 256 (2-3):87-94, 2000.

ATLI, G. Response of catalase activity to  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. Comp. Biochem. Physiol., C. 143:218–224, 2006.

ATLI, G.; CANLI, M. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. Comp. Biochem. Physiol., C. 145(2):282-287, 2007.

AWASTHI, Y. C.; et al. A new group of glutathione S-transferases with a protective role against lipid peroxidation. In: VERMEULEN, N.P.E.; MULDER, G.H.; NIEUWENHUYSE, H.; PETERS, W.H.M.; VAN BLADEREN, P.J. editors. Glutathione S-Transferases, Structure, Function and Clinical Implications. London: Taylor and Francis Ltd, 111-124, 1996.

BARCELOUX, D. G. Copper. J. Toxicol. Clin. Toxicol. 37(2):217-30, 1999.

BEA, S. A.; et al. Deposits: A discussion based on reactive transport modeling. J. Contam. Hydrol., 111:65-82, 2010.

BERALDO, H. Contribuições da química inorgânica para a química medicinal. In Cadernos temáticos de Química nova. 6: 4-6, 2005.

BERNET, D.; et al. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. J. Fish Dis. 22:25-34, 1999.

BIRGE, W. J.; BLACK, J. A. Effects of copper on embryonic and juvenile stages of aquatic animals. In NRIAGU, J. O. editor. Copper in the environment. Part 2: health effects. John Wiley, New York. 373-399, 1979.

BOCQUENÉ, G.; et al. Joint action of combinations of pollutants on the acetylcholinesterase activity of several marine species. Ecotoxicology 4:266-279, 1995.

BOEGER, W. A.; et al. Avaliação dos efeitos da sísmica com cabo de fundo sobre peixes recifais e sobre zooplâncton marinho. GIA-UFPR, 2004

BORKOW, G.; GABBAY, J. Copper as a biocidal tool. Curr. Med. Chem.12(18): 2163-2175, 2005.

BOUSKILL, N.J.; et al. Differentiating copper and arsenic toxicity using biochemical biomarkers in *Asellus aquaticus* and *Dreissena polymorpha*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 65: 342–349, 2006.

BRADFORD, M. A. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72:248-254, 1976.

BRYAN, G. W.; LANGSTON, W. J. Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special reference to United Kingdom estuaries: a review. Environ. Poll. 76:89-131, 1992.

BURGEOT, T.; et al. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea. Mar. Ecol. Prog. Ser. 131:125-141, 1996.

CAIN, D. J.; et al. Aquatic insects as bioindicators of trace element contamination in cobble-bottom rivers and streams. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 49:2141-2154, 1992.

CAMARGO, M. M. P.; MARTINEZ, C. B. R. Histopathology of gills, kidney and liver of a neotropical fish caged in an urban stream. Neotropical Ichthyology, 5(3): 327-336, 2007.

CARNEIRO, P.C.F.; et al. Jundiá, um grande peixe para a Região Sul. Panorama da Aqüicultura.12:41-46, 2002.

CARNEIRO, P. C. F.; MIKOS, J. D. Frequência alimentar de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen*. Ciência Rural Santa Maria, 35(1):187-191, 2005.

CHAGAS, A. P. Os 200 anos da pilha elétrica. Química Nova. 23(3):427-429, 2000.

CHANG, A. C.; et al. Cadmium uptake for swiss chard grown on composted sewage sludge treated field plots: plateau or time bomb? J. Environ. Qual. 26:11-19, 1997.

CHENG, T. C. Use of copper as a molluscicide. In NRIAGU, J. O. editor. Copper in the environment. Part 2: health effects. John Wiley, New York. 401-432, 1979.

CLEMENTE, Z. Monitoramento do reservatório de Alagados, Ponta Grossa (PR) através de biomarcadores e análise de cianotoxinas. Dissertação de mestrado apresentada na Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

CONAMA. Resolução 020-1986. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente, 1986. <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res86/res2086.html>.> acesso em 10 de Maio de 2010.

CONAMA. Resolução 357-2005. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2005. <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>.> acessado em 10 de Maio de 2010.

CRUZ, I. Das vantagens de não ser precioso: aspectos da exploração e uso do cobre em Portugal (1789-1889). [www.triplov.com/isabel\\_cruz/cobre/memor.html](http://www.triplov.com/isabel_cruz/cobre/memor.html). Acesso em 24 de Abril de 2010.

CROUCH R.K, GANDY S. E, KIMSEY G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. Diabetes. 35:235-41, 1981.

CUNHA, I.; et al. Effects of copper and cadmium on cholinesterase and glutathione S-transferase activities of two marine gastropods (*Monodonta lineata* and *Nucella lapillus*) Comp. Biochem. Physiol., C. 145(4):648-657, 2007.

DALLINGER, R.; RAIMBOW, P.S. Ecotoxicology of metals in invertebrates. Chelsea ,Lewis publishers, 1993.

DARÓZ, S. C.; et al. Altos níveis dietéticos de cobre no desempenho e no colesterol sérico e muscular de frangos de corte. Sci. Agricol. 58(1):1-5, 2001.

DAUTREMEPUITS, C.; et al. Antioxidant response modulated by copper in healthy or parasitized carp (*Cyprinus carpio* L.) by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda). Biochim. Biophys. Acta 1573:4–8, 2002.

DAUTREMEPUITS, C.; et al. Modulation in hepatic and head kidney parameters of carp (*Cyprinus carpio* L.) induced by copper and chitosan. Comp. Biochem. Physiol., C.13: 325-333, 2004.

Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM). Cobre. <http://www.dnpm.gov.br/suma2000/COBRE.doc>. Acesso em 21/04/2010 às 21:22.

DETHLOFF, G. M. ; et al. Alterations in physiological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with exposure to copper and copper/zinc mixtures. Ecotoxicol. Environ. Safety. 42:253-264, 1999.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol. Rev. 82: 47–95, 2002.

DUFFUS, J. H. "Heavy Metals" - a meaningless term? Pure Appl. Chem. 74(5):793–807, 2002.

EBRAHIMPOUR, M.; MUSHRIFAH, I. Heavy metal concentrations (Cd, Cu and Pb) in five aquatic plant species in Tasik Chini, Malaysia. Environ. Geo. 54:689–698, 2008.

EISLER, R. Copper hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. U.S. Geological Survey, Biological Resources Division, Biological Science Report USGS/BRD/BSR--1998-0002, 1998.

EISLER, R. Handbook of chemical risk assessment: health hazards to humans, plants and animals. Volume 1: Metals. Lewis Publishers, New York, 2000.

EISLER, R.; GARDNER, G. R. Acute toxicology to an estuarine teleost of mixtures of cadmium, copper and zinc salts. J. Fish Biol. 5:131-142, 1973.

ELLMAN, G. L.; et al. New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7:88-95, 1961.

EVANS, D. W.; et al. Trace element concentrations in fish livers: Implications of variations with fish size in pollution monitoring. Mar. Pollut. Bull. 26(6):329-334, 1993.

FAROMBI, E. O.; et al. Biomarkers of Oxidative Stress and Heavy Metal Levels as Indicators of Environmental Pollution in African Cat Fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. Int. J. Environ. Res. Public Health. 4(2):158-165, 2007.

FASHIMI, H. D.; CAJARAVILLE, M. P. Induction of peroxisome proliferation by some environmental pollutants and chemicals in animal tissues. In: CAJARAVILLE, M. P.; CROUCH R.K.; GANDY S. E.; KIMSEY G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. Diabetes. 35:235-41, 1981.

Fichas Internacionais de Seguridad Química – cobre  
[http://training.itcilo.it/actrav\\_cdrom2/es/osh/ic/7440508.htm](http://training.itcilo.it/actrav_cdrom2/es/osh/ic/7440508.htm). Acesso em 22 de Abril de 2010.

FILHO, D.W. Fish antioxidant defences – a comparative approach. Braz. J. Med. Res. 29:1735–1742. 1996.

FIRAT, O.; KARGIN, F. Response of *Cyprinus carpio* to copper exposure: alterations in reduced glutathione, catalase and proteins electrophoretic patterns. Fish Physiol. Biochem. DOI 10.1007/s10695-010-9380-0, 2010.

FRASCO, M. F.; et al. Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. Biomarkers 10:360–374, 2005.

GARCIA, L. M.; et al. Characterization of cholinesterase from guppy (*Poecilia reticulata*) muscle and its in vitro inhibition by environmental contaminants. *Biomarkers*. 5:274–284, 2000.

GERMANI, D. J. A mineração no Brasil – Relatório final. Rio de Janeiro, 2002. [www.scribd.com/doc/.../A-Mineracao-no-Brasil](http://www.scribd.com/doc/.../A-Mineracao-no-Brasil). Acessado em 04/05-2010 às 19:36.

GOMES, L.C.; et al. Biologia do Jundiá *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI, PIMELODIDAE). *Cienc. Rural*. 30(1): 179-185, 2000.

GRAVATO, C.; et al. Oxidative stress, liver biotransformation and genotoxic effects induced by copper in *Anguilla anguilla* L. – the influence of pre-exposure to b-naphthoflavone. *Chemosphere* 65:1821–1830, 2006.

GROSSI, M. G. L. Avaliação da qualidade dos produtos obtidos de usinas de compostagem brasileiras de lixo doméstico através de determinação de metais pesados e substâncias orgânicas tóxicas. Tese de doutorado apresentada na Universidade de São Paulo. São Paulo, 1993.

GUEDES, D.S. Contribuição ao estudo da sistemática e alimentação de jundiás (*Rhamdia* spp) na região central do Rio Grande do Sul (Pisces, Pimelodidae). Dissertação de mestrado apresentada na Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1980.

GUILHERMINO, L.; et al. Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with Juvenile *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 32:727-738, 1996

GUILOSKI, I. C. Estudos in vitro e in vivo dos efeitos de pesticidas em peixes nativos. Dissertação de mestrado apresentada na Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. Free Radical. Biol. Med. Nova York: Oxford University Press.1:851, 2007.

HARRIS, Z. L.; GITLIN, J. D. Genetic and molecular basis for copper toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* 63: 836S-41S, 1996.

HART, B. T. Uptake of trace metals by sediments and suspended particulates: a review. *Hidrobiol.* 91:299-313, 1982.

HANSEN, J. I.; MUSTAFA, T.; DEPLEDGE, M. Mechanisms of copper toxicity in the shore crab, *Carcinus maenas*. Effects on key metabolic enzymes, metabolites and energy charge potential. *Mar. Biol.*114:259-264, 1992.

HASLER, A. D.; SCHOLZ, A. T. Olfactory Imprinting and Homing in Salmon. Springer–Verlag, Berlin, 1983.

HAVELKOVA, M.; et al. Biomarkers of Contaminant Exposure in Chub (*Leuciscus cephalus* L.) – Biomonitoring of Major Rivers in the Czech Republic. *Sensors*. 8:2589-2603, 2008.

Hazardous Substances Data Bank (HSDB), Copper, 2000.

HEATH, A. G. Water pollution and fish physiology. Florida, Lewis Publishers, 1995.

HINTON, D. E.; et al. Liver toxicity. In: DI GIULIO, R. T.; HINTON, D. E. (Eds). Toxicology of fishes. D.E. USA: CRC press, 327-400, 2008.

História do cobre. <<http://www.lusiancoppers.com/files/HistoriaCobre.pdf>>, acesso em 25 de Abril de 2010.

HOYLE, I.; et al. Dietary copper exposure in the African walking catfish, *Clarias gariepinus*: Transient osmoregulatory disturbances and oxidative stress. Aquat.Toxicol. 83(1):62-72, 2007.

HUGGETT R. J.; KIMERLE, R. A.; MEHRLE Jr, P. M.; BERGMAN, H. L. Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton: Lewis Publishers. 155 –196, 1992.

International Cooper Association; Cobre bactericida; Disponível em: <[http://www.procobre.org/pr/sobre\\_o\\_cobre/pu\\_saude\\_06.html](http://www.procobre.org/pr/sobre_o_cobre/pu_saude_06.html)> acesso em 24 de Fevereiro de 2010.

IPCS, Copper. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (Environmental Health Criteria 200). 1998.

JIANG, Z. Y; et al. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. Analyt. Biochem. 202: 384-389. 1992.

KÄGI, J. H. R. Evolution, structure and chemical activity of class I metallothioneins: an overview. In: SUZUKI, K. T.; IMURA, N.; KIMURA, I. (Eds). Metallothionein III: biological roles and medical Implications. Birkhauser Verlag Basel. 29-55, 1993.

KAMUNDE, C.; et al. Copper metabolism in actively growing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): interactions between dietary and waterborne copper uptake. J. Exp. Biol. 205: 279–290, 2002.

KEEN, J. H.; et al. Biol. Chem., 251:6183–6188, 1976.

KHAN, R.; et al. Heavy Metal Pollution Assessment in Surface Water Bodies and its Suitability for Irrigation around the Neyevli Lignite Mines and Associated Industrial Complex, Tamil Nadu, India. Mine Wat. Environ. 24:155–161, 2005.

KIRCHGESSNER, M.; et al. Interactions of copper with other trace elements. In NRIAGU, J. O. editor. Copper in the environment. Part 2: health effects. John Wiley, New York. 433-472, 1979.

KNIE, J.L.W.; LOPES, E. W. B. Testes Ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis: FATMA / GTZ. 289, 2004.

LACKNER, R. "Oxidative stress" in fish by environmental pollutants. In: BRAUNBECK, T.; HINTON, D.E.; STREIT, B. (eds.) Fish Ecotoxicol. Basel, Switzerland, Birkhäuser Verlag. 203-224, 1998.

LEKNES, I. L. Melano-macrophage centres and endocytic cells in kidney and spleen of pearl gouramy and platyfish (Anabantidae, Poeciliidae: Teleostei). Acta Histochem., 109:164-168, 2007.

LENARTOVA, V.; et al. Antioxidant and detoxifying fish enzymes as biomarkers of river. Biomarkers. 2(4):247-252, 1997.

LIEBLER, D. C.; REED, D. J. Free-radical defense and repair mechanisms. In: WALLACE, K. B. Free Radical Toxicology. Washington: Taylor & Francis. 141- 171, 1997.

LIANG, Y.; et al. Reclamation of wastewater for polyculture of freshwater fish: bioaccumulation of trace metals in fish. Water Res. 33(1):2690-2700, 1999.

LIMA, I. A. V.; MIYADA. V. S. Cobre orgânico e inorgânico como promotores do crescimento de leitões recém-desmamados. R. Bras. Zootec., 32 (6)1657-1662, 2003 (Supl. 1).

LIU, H.; et al. Effects of copper and its ethylenediaminetetraacetate complex on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 65:350–354, 2006.

LIVINGSTONE, D. R. Contaminant-stimulates reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. Mar. Poll. Bull. 42(8):656-666, 2001.

LIVINGSTONE, D. R.; et al. Prooxidant, antioxidant and 7-ethoxyresoufin O-deethylase (EROD) activity responses in liver of Dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals. Mar. Poll. Bull. 26(11):602-606, 1993.

LOPES, P. A.; et al. Response of antioxidant enzymes in freshwater fish populations (*Leuciscus alburnoides*) complex to inorganic pollutants exposure. Sci. Total Environ. 280:153-163, 2001.

MATHER-MIHAICH, E.; DIGIULIO, R. T. Oxidant, mixed-function oxidase and peroxisomal responses in channel catfish exposed to a bleached mill effluent. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20, 391-397, 1991.

MEADOR, J. P. The interaction of pH, dissolved organic carbon, and total copper in the determination of ionic copper and toxicity. Aquat. Toxicol. 19:13-32, 1991.

MELA, M. Uso de biomarcadores na avaliação dos efeitos do metilmercúrio em *Hoplias malabaricus* (BLOCK, 1794) traíra. Dissertação de mestrado apresentada na Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.



MENKISSOGLU, O.; LINDOW, S. E. Relationship of free ionic copper and toxicity to bacteria in solutions of Organic Compounds. *Phytopathol.* 81: 1258- 1263, 1991.

Ministério da Saúde, Portaria N.º 518, de 25 de Março de 2004.<<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=22322>> acesso em 07 de Maio de 2010.

MOHAMED, S.; et al. Proportioning of Biomarkers (GSH, GST, Ache, Catalase) Indicator of Pollution at *Gambusia affinis* (Teleostei Fish) Exposed to Cadmium. *Environ. Res. J.* 2(4):177-181, 2008.

MONTSERRAT, J. M. et al. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comp. Biochem. Physiol.C.*146:221-234, 2007.

MYERS, M.S.; FOURNIE, J.W. Histopathological biomarkers as integrators of anthropogenic and environmental stressors. In: *Biological indicators of aquatic ecosystem stress* (ADAMS, S.M.) American Fisheries Society, 24:221-287, 2002.

National Academy of Sciences (NAS). Copper. Committee on Medical and Biologic Effects of Environmental Pollutants, National Research Council, National Academy of Sciences, Washington, D.C. 115, 1977.

NAVARRO, R. F. A evolução dos materiais. Parte 1: da Pré-história ao início da Era Moderna. *REMAP.* 1(1): 01-1, 2006.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free radical biology and medicine*, v. 31, n.11, p. 1287-1311, 2001.

NRIAGU, J. O. A history of global metal pollution. *Science.* 272: 223-224, 1996.

NRIAGU, J. O. The global copper cycle. In NRIAGU, J. O. editor. *Copper in the environment. Part 1: ecological cycling.* John Wiley, New York, 1-17, 1979.

NRIAGU, J. O.; PACYNA, J. M. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature.* 333:134-139, 1988.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; et al. Evaluation of tributyltin subchronic effects in tropical freshwater fish (*Astyanax bimaculatus*, Linnaeus, 1758). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 51:161-167, 2002.

PALACHE, C.; FOSHAG, W. F. Antofagastite and bandylite, two new copper minerals from Chile. *Am. Mineral.* 23, 85-90. 1938.

PAMPLONA, J. H. Avaliação dos efeitos tóxicos da dipirona sódica em peixe *Rhamdia Quelen*: estudo bioquímico, hematológico e histopatológico. Dissertação de mestrado apresentada na Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

PARIS-PALACIOS, S.; et al. Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate. *Aquat. Toxicol.* 50:109–124, 2000.

PARKINSON, A. Biotransformation of xenobiotics. In: Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, (C. D., KLAASSEN, org). 113 -186, 2001.

PAYNE, J. F.; et al. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in new found land. *Mar. Poll. Bull.* 32:225-231, 1996.

PEDRAJAS, J. R.; et al. Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms of Cu, Zn-superoxide dismutase as potential biomarkers. *Chem. Bio. Interact.* 98(3):267-282, 1995.

PEDROZO, M. F. M.; LIMA, I. V. Ecotoxicologia do cobre e seus compostos. In Série Cadernos de Referência Ambiental Volume 2. Salvador, 2001.

PEREIRA, F.; et al. Desempenho de diferentes fungicidas no controle de *Colletotrichum gloeosporioides* em goiabeira serrana. XX Congresso Brasileiro de Fruticultura 54th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture, 2008.

PEREIRA, M. O.; et al. Metal concentrations in surface sediments of Paraíba do Sul River (Brazil). *J. Radioanal. Nucl. Ch.* 269 (3):707-709, 2006.

PEREIRA, P.; et al. Combined use of environmental data and biomarkers in fish (*Liza aurata*) inhabiting a eutrophic and metal-contaminated coastal system – Gills reflect environmental contamination. 69(2):53-62, 2010.

PERNEZNY, K.; et al. Comparison of two culture media for determination of the copper resistance of *Xanthomonas strains* and their usefulness for prediction of control with copper bactericides. *Crop. Prot.* 27(2): 256-262, 2008.

PIAIA, R.; et al. Growth and survival of fingerlings of *Rhamdia quelen* exposed to different light regimes. *Aquacult. Int.*, 7: 201-205, 1999.

PICANÇO, J. L. Comentários sobre o artigo O Paraná na história da mineração no Brasil no século XVII de Liccardo A., Sobanski II A., Chodur, N. L. Boletim paranaense de geociências 54-41:49. Boletim Paranaense de Geociências 56:121-123, 2005.

PINTO, N. F. J. A.; FERNANDES, F. T. Avaliação de fungicidas no controle da mancha foliar do milho causada por *Phyllosticta* sp. (*Phaeosphaeria maydis*). *Fitopatol. Bras.* 20:333, 1995 (Suplemento).

POUGH, H. F.; et al. A vida dos vertebrados. 2ed. São Paulo. Atheneu, 1999.

POURAHMAD, J.; O'BRIEN, A. A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for Cu<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup>, *Toxicology.* 143: 263–273, 2000.

RABITTO, I.S.; et al. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60:147-156, 2005.

RADI, A. A. R.; MATKOVICS, B. Effects of metal ions on the antioxidant enzyme activities, protein contents and lipid peroxidation of carp tissues. *Comp. Biochem. Physiol., C.* 90: 69-72, 1988.

REGOLI, F.; et al. Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. *Mar. Environ. Res.* 54(3-5):419-423, 2002.

REGOLI, F.; PRINCIPATO, G. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals in different field and laboratory conditions: implication for a proper use of biochemical biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 3:143-164, 1995.

REID, S. S.; MCDONALD, D. G. Metal binding activity of the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48:1061-1068, 1991.

REIS, P. R.; TEODORO, A. V. Efeito de oxicloreto de cobre sobre a reprodução do ácaro-vermelho-do-cafeeiro, *Oligonychus ilicis* (McGregor, 1917). *Ciênc. Agrotec.* 24(2):347-352, 2000.

ROCHA, D. A. M. Alterações de enzimas de biotransformação de xenobióticos na fase inicial da esquistossomose mansônica murina. Dissertação de mestrado apresentada à Escola Nacional de Saúde Pública – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004.

ROEX, E. W. M.; et al. Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. *Aquatic Toxicol.* 64: 451-460, 2003.

ROMANI, R.; et al. Increased acetylcholinesterase activities in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. *Chem. Biol. Interact.* 145(3):321–329, 2003.

ROMÉO, M.; et al. Responses of *Hexaplex trunculus* to selected pollutants. *Sci. Total Environ.* 359:135–144, 2006.

ROSA, L. C. de La.; et al. Superoxide anions and hydrogen peroxide induce hepatocyte death by different mechanisms: involvement of JNK and ERK MAP kinases. *J. Hepatol.* 44(5): 918-929, 2005.

RUBINGER, C. F. Seleção de métodos biológicos para a avaliação toxicológica de efluentes industriais. Dissertação de mestrado apresentada na Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

RYDER, T. A.; BOWEN, I. D. The slug foot as a site of uptake of copper molluscicide. *J. Invertebr. Pathol.* 30(3):381-386, 1977.

SALOMONS, W.; FORSTNER, U. Metals in the Hydrocycle. Springer Verlag. 1984. 349p.

SANCHEZ, W.; et al. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. Environ. Toxicol. Pharmacol. 19:177–183, 2005.

SANTOS, A. S. Análise histológica e ultraestrutural do tecido hepático de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) tratadas com ração contendo diferentes níveis de cobre. Dissertação de mestrado apresentada na Universidade do Estado de São Paulo, Jaboticabal, 2003.

SCHMIDT-NIELSEN, K. Fisiologia animal. Adaptação e Meio ambiente. São Paulo, Santos, ed. 5, 1996.

SCHUBERT, L. B.; et al. Avaliação do perfil hepático de camundongos após administração oral de extrato de *Oscillatoria* sp. Estimulado por sulfato de cobre. Serviço Autônomo Municipal de Água e Esgoto, 2003.

SEEDORF, M.; SOLL, J. Copper chloride, an inhibitor of protein import into chloroplasts. FEBS Letters. 367:19- 22, 1995.

SEVANIAN, A.; MCLEOD, L. Formation and biological reactivity of lipid peroxidation products. In: WALLACE, K. B. Free Radical Toxicology. Washington: Taylor & Francis. 47-70, 1997.

SIES, H.; et al. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. FEBS Letters. 103: 287- 290, 1979.

SILVA, J. C. Biomarcadores morfológicos e análise da bile em peixe para avaliação da qualidade da água do Rio Iguaçu. Dissertação de mestrado apresentada na Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SILVA DE ASSIS, H. C. Der Einsatz von Biomarkern zur summarischen Erfassung von Gewässerverschmutzungen. Tese de doutorado apresentada na Universidade Técnica de Berlim, Alemanha, Julho, 1998.

SILFVERGRIP, A.M.C. A systematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae). Tese de PhD apresentada na Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History, Stockholm, Sweden, 1996.

SODRÉ, F. F. Especiação do cobre em águas naturais: influência de fatores associados a urbanização. Tese de doutorado apresentada na Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

STENESH, J. Biochemistry. New York: Plenum. In: Bioindicadores de contaminação em peixes de água doce, por exposição ao Chumbo (II): ensaios laboratoriais e estudos de caso preliminar no Rio Ribeira (SP/PR) (COSTA, J. R.M. A), 1998.

STEPHENSEN, E.; et al. Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbour on the southwest coast of Iceland. *Aquat. Toxicol.* 48:431-442, 2000.

STURM, A.; DA SILVA ASSIS, H.C. & HANSEN, P.D. Cholinesterases of marineteleost fish: enzymological characterization and potencial use in the monitoring of neurotoxic contamination. *Mar. environmental research*, 47:389-398, 1999.

SURESH, A. ; et al. Comparative study on the inhibition of acetylcholinesterase activity in the freshwater fish *Cyprinus carpio* by mercury and zinc. *Biochem. Int.* 26:367-375, 1992.

SULTAN, S.; KHAN S. M. Histopathological studies on the liver and gills in *Carassius auratus* exposed to copper sulphate. *Indian J. Fish.*, 30(1):94-98, 1983.

TEMPLETON, D. M.; et al. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches. *Pure Appl. Chem.* 72:1453-1470, 2000.

TOMAZELA, A.L. ; et al. Doses de nitrogênio e fontes de Cu e Mn suplementar sobre a severidade da ferrugem e atributos morfológicos do milho. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo, Sete Lagoas.* 5(2):192-201, 2006.

TOTH, L.; et al. Some effect of CuSO<sub>4</sub> on carp. *J. Environ. Sci. Health.*, 31 (B): 627-635, 1996.

TREIMAN, K. et al. Rep. Baltimore Johns Hopkins University School of Public Health, no. 6, p.1-35, 1995

TREVISAN, R. Marcadores de estresse oxidativo e outros parâmetros biológicos em peixes e bivalves como ferramentas de monitoramento ambiental: análise de dois ecossistemas catarinenses. Dissertação apresentada para obtenção do grau em Barachel apresentada na Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

TRUCJOT, J. P.; BOITEL, F. In vitro and in vivo effects of copper on hemocyanin-O<sub>2</sub> binding in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 103:339-343, 1992.

TRUTE, M.; et al. Characterization of hepatic glutathione S-transferases in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquat. Toxicol.* 81:126-136, 2007.

UCHIDA, K.; KAWAKISHI, S. Identification of oxidized histidine generated at the active-site of Cu,Zn-superoxide dismutase exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Selective generation of 2-oxo-histidine at the histidine-I 18. *J. Biol. Chem.* 269:2405-2410, 1994.

U.S. Environmental Protection Agency (USEPA), Interim guidance on interpretation and implementation of aquatic life criteria for metals. Washington DC, 1992.

U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). Ambient water quality criteria for copper. U.S. Environmental Protection Agency Report 440/5-80-036. 162, 1980.

- VALAVANIDIS, A.; et al. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64:178- 189, 2006.
- VAN DER OOST, R.; et al. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 13: 57-149, 2003.
- VARO, I.; et al. Effect of sublethal concentrations of copper sulphate on seabream *Sparus aurata* fingerlings. *Aquat. Living Resour.* 20:263-270, 2007.
- VASÁK, M. Advances in metallothionein structure and functions. *Journal of Trace Elem.Med.Biol.*19(1):13 - 17, 2005.
- VENTURA, E. C. Biomarcadores Bioquímicos em *Orthopristis ruber* (Cuvier, 1830) (Perciformes – Haemulidae) e *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823)(Perciformes – Sciaenidae), coletados na costa sudeste brasileira. Dissertação de Mestrado apresentada na Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 2004.
- VIARENGO, A.; et al. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 146(3): 281-300, 2007.
- VOLESKY, B.; HOLAN, Z. R. Biosorption of Heavy Metals. *Biotechnol. Prog.*11:235-250, 1995.
- VON SPERLING, E. Etimologia aquática. *RBRH.*10(2): 73-81, 2005.
- VUTUKURU, S. S.; et al. Studies on the Development of Potential Biomarkers for Rapid Assessment of Copper Toxicity to Freshwater Fish using *Esomus danricus* as Model. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2(1):63–73, 2005.
- WALLINDER, O. I.; et al. Effects of exposure direction and inclination on the runoff rates of zinc and copper roofs, *Corros. Sci.*42(8), 1471-1487, 2000.
- WEISS,C.M. The determination of cholinesterase in the brain tissues of three species of freshwater fish and its inactivation in vivo. *Ecology* 30: 194-99, 1958.
- WENDELAAR BONGA, S. E. The Stress Response in Fish. *Physiol.Rev.* 77(3): 591-620, 1997.
- WILHELM FILHO, D. Fish antioxidant defenses – A comparative approach. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 29: 1735-1742, 1996.
- WINNER, R. W.; et al. Seasonal variability on the sensitivity of freshwater lentic communities to a chronic copper stress. *Aquat. Toxicol.* 17:75-92, 1990.
- WINSTON, G. W.; DIGIULIO, R. T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19:137–161, 1991.
- WOLF, J.C.; WOLFE, M.J. A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish.

Toxicol. Pathol. 33, 75-85, 2005.

WONG, D. W. S.; WHITAKER, J. R. Handbook of Food Enzymology, New York, USA, 2002.

WOODY, C. A. Copper: Effects on Freshwater Food Chains and Salmon, 2007. <[http://www.fish4thefuture.com/pdfs/Woody\\_Copper\\_Effects\\_to\\_Fish%20-%20FINAL2007.pdf](http://www.fish4thefuture.com/pdfs/Woody_Copper_Effects_to_Fish%20-%20FINAL2007.pdf)> acesso em 15 de Maio de 2010.

ZATTA, P.; et al. In vivo and in vitro effects of aluminum on the activity of mouse brain acetylcholinesterase, Brain Res. Bull. 59: 41-45, 2002.

ZHOU, W.; et al. The role of feed consumption and feed efficiency in copper-stimulated growth. J. Anim. Sci., 72:.2385-2394, 1994.